

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LARISSA BERTOLLI GUIMARÃES CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE

**PREVALÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E AVALIAÇÃO CLÍNICA
BUCAL EM PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI**

CURITIBA

2014

LARISSA BERTOLLI GUIMARÃES CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE

**PREVALÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E AVALIAÇÃO CLÍNICA
BUCAL EM PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Hemato-Oncologia e Genética Pediátrica – Odontologia Pediátrica e Estomatologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Neiva Isabel Rodrigues
Magdalena

Co-orientadores: Prof^a. Dr^a. Melissa Rodrigues de
Araujo

Prof. Dr. Cassius Torres

Prof^a. Dr^a. Sônia Raboni

CURITIBA

2014



MINISTERIO DA EDUCACAO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA
SETOR DE CIENCIAS DA SAUDE

*Programa de Pós-Graduação Mestrado e Doutorado
em Saúde da Criança e do Adolescente*



Parecer

A banca examinadora instituída pelo colegiado do **PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO
MESTRADO E DOUTORADO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE** do
Setor de Ciências Saúde da Universidade Federal do Paraná após arguir a Mestranda

Larissa Bertolli Guimarães Cavalcanti de Albuquerque

em relação ao seu trabalho de Dissertação de Mestrado intitulado

**Prevalência do Papilomavirus Humano (HPV) e Avaliação
Clínica Bucal em Pacientes com Anemia de Fanconi**

e de parecer favorável a *Aprovação* da acadêmica habilitando-a ao título de

Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente

Área de concentração em *Hematologia-Oncoologia Pediátrica -
Odontologia*.

Curitiba 05 de dezembro de 2014

Professora Neuza Isabel Rodrigues Magdalena
UFPR Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Professora Ângela Fernandes
UNINOVE SP Primeira Examinadora

Professora Carmem Maria Sales Bonfim
UFPR Segunda Examinadora

Professora Mônica Nunes Lima Cat
UFPR Terceira Examinadora

DEDICATÓRIA

À minha família.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Neiva Isabel Magdalena Rodrigues, pela orientação, disponibilidade e gentileza.

Ao Departamento de Pediatria, em especial ao seu Grupo Fundador, ainda essencial: Prof. Dr. Izrail Cat (*in memorian*), Prof. Orival Costa, Prof. Dr. José Dinarte Giraldi e Prof^a. Leide Parolin Marinoni, sem os quais este Departamento e seu Programa de Pós-Graduação não atingiriam seus atuais níveis de excelência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, em nome de sua coordenação, Prof^a. Dr^a. Rosana Marques Pereira.

À Dra. Karine Lyko, Dra. Anna Clara D'Agulham e Dra. Renata Possebom pela ajuda durante o período de coleta das amostras.

À Bianca Rodrigues, pela incansável paciência e amizade.

Ao Prof. Dr. José Zanis Neto, Prof. Dr. Ricardo Pasquini e à Disciplina de Hematologia desta Instituição, pela compreensão e decisões que viabilizaram este trabalho. Agradecimentos extensivos aos Médicos Residentes, que no período de estudo estiveram envolvidos na assistência destas crianças.

À Dra. Carmem Bonfim, exemplo de profissional e ser humano, uma pessoa especial que merece toda minha consideração, admiração e respeito. Agradeço pela motivação, acompanhando e auxiliando em etapas importantes.

Aos Hematologistas Pediátricos Dr. Lisandro Lima Ribeiro e Dra. Gisele Loth, pelo profissionalismo e disponibilidade, peças fundamentais neste estudo.

À toda equipe de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas – UFPR, pelo acolhimento, por amenizar o trauma emocional destas crianças e pela competência e carinho dedicado a elas.

A toda equipe do Laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em especial à Dra. Sônia Mara Raboni, Dra. Meri Nogueira, Dra.

Luine Vidal, Suzana Carstensen, e à Bióloga Carla Ferreira que incansavelmente compartilharam seus conhecimentos laboratoriais, me ensinaram, cederam o espaço e equipamento, possibilitando a realização da análise das amostras.

Ao Ralf Dietrich e Dra. Eunick Velleuner por me tratarem com tanto carinho e por ensinar-me tanto sobre a Anemia de Fanconi (*You're treasures!*).

A Associação Paranaense de Apoio a Criança com Neoplasia - APACN-PR, pelo apoio incondicional aos pacientes com Anemia de Fanconi.

Aos meus colegas de pós-graduação, Yuri, Rodrigo Carvalho, Marilza Modesto, Rita Uhle, Cláudia, Nádia e Larissa. Jamais me esquecerei, dos nossos churrascos, pizzas, encontros, risadas e das aulas de microensino com Prof. Dr. José Dinarte Giralddi e Profa. Leide Parolim Marinoni que acompanhei ao lado de vocês, que considero agora, grandes amigos.

À aluna de Iniciação Científica Aline Pícolo pelo auxílio na realização da pesquisa bibliográfica.

Aos Cirurgiões-Dentistas Dr. Ricardo Pasquini Filho, Dra. Karina Liko e Dra. Renata Possebom, pelo apoio durante a coleta das amostras dos pacientes.

À Dra. Melissa Rodrigues de Araujo pela ajuda, apoio, carinho, paciência, motivação e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Cassius Torres por estar sempre à disposição e por sua amizade.

À Profa. Dra. Mônica Nunes Lima Cat, pela incansável ajuda em absolutamente todos os momentos.

Aos pacientes e seus familiares pela compreensão e confiança depositada no Serviço.

A equipe do *Cincinatti Children's Hospital* pelo apoio financeiro na doação dos *kits* de coleta de material.

Ao *St Jude Children's Research Hospital* para o suporte para o desenvolvimento desta área neste Hospital.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por ter concedido a bolsa de estudos.

Ao grande amigo George S. F. Secum pelos conselhos.

Aos meus pais, meus amores, que me ensinaram que o conhecimento é algo que nunca se perde e nunca é demais.

Ao meu marido, Carlos Guilherme, meu 'Gui', e meu filho Gustavo, meu 'Gu', razões da minha vida, por estarem sempre ao meu lado.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	17
1.1.1 Objetivos Gerais	17
1.1.2 Objetivos Específicos	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 ANEMIA DE FANCONI.....	19
2.1.1 Características Clínicas e Hematológicas	20
2.1.2 Epidemiologia	25
2.1.3 Exames Laboratoriais e Diagnóstico	26
2.1.4 Tratamento	28
2.1.5 MANIFESTAÇÕES BUCAIS	32
2.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 TIPO DE ESTUDO	40
3.2 LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO	40
3.3 GRUPO DE ESTUDO	40
3.3.1 Casuística.....	40
3.3.2 Critérios de Inclusão.....	40
3.3.3 Critérios de Exclusão.....	41
3.3.4 População de Estudo	41
3.3.5 Amostra e Técnica de Amostragem	41
3.4 GRUPO CONTROLE	42

3.4.1 Casuística.....	42
3.4.2 Critérios de Inclusão.....	42
3.4.3 Critérios de Exclusão.....	42
3.4.4 População de Estudo	42
3.4.5 Pareamento.....	43
3.5 HIPÓTESE	43
3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	43
3.7 PROCEDIMENTOS.....	43
3.7.1 Coleta das Amostras	44
3.7.2 <i>Abbot Real Time High Risk HPV®</i>	46
3.8 REGISTRO E GERENCIAMENTO DE DADOS	49
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
3.10 ÉTICA EM PESQUISA	50
3.11 MONITORIZAÇÃO DA PESQUISA.....	50
3.12 FOMENTO PARA A PESQUISA, PROFISSIONAIS E SERVIÇOS ENVOLVIDOS	50
4 RESULTADOS.....	51
4.1 PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI	51
4.1.1 GRUPO AF-NT – PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI NÃO SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA.....	52
4.1.2 GRUPO AF-T – PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI QUE FORAM SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA	57
4.2 GRUPO CONTROLE – PACIENTES SEM ANEMIA DE FANCONI E SAUDÁVEIS.....	62
4.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS CONTROLE, AF-NT E AF-T	65

4.4 EXAME DO HPV DE ALTO RISCO	71
4.5 ANÁLISE PAREADA PARA HPV DE BAIXO E ALTO RISCO	71
5 DISCUSSÃO	74
5.1 EPIDEMIOLOGIA NA ANEMIA DE FANCONI	74
5.2 PREVALÊNCIA DE HPV EM AF	74
5.3 PREVALÊNCIA HPV POPULAÇÃO EM GERAL - GRUPO CONTROLE	76
5.4 MÉTODOS LABORATORIAIS DE DIAGNÓSTICO DE HPV	77
5.5 HÁBITOS E COMPORTAMENTOS SOCIAIS NOS PACIENTES COM AF E GRUPO CONTROLE	80
5.6 LESÕES BUCAIS SUGESTIVAS DE HPV, CARCINOMA E LESÕES CARIOSAS EM PACIENTES COM AF E GRUPO CONTROLE	83
6 CONCLUSÃO	86
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
8 REFERÊNCIAS.....	88
APÊNDICES	99
ANEXOS	101
PRODUÇÃO ACADÊMICA.....	104

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DAS CIDADES E ESTADOS DE ORIGEM DOS PACIENTES DO GRUPO AF-NT	56
TABELA 2 - HÁBITOS DOS PACIENTES DO GRUPO AF-NT	56
TABELA 3 - ACHADOS DE EXAME CLÍNICO DOS PACIENTES DO GRUPO AF-NT	57
TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS CIDADES E ESTADOS DE ORIGEM DOS PACIENTES DO GRUPO AF-T	61
TABELA 5 - HÁBITOS DOS PACIENTES DO GRUPO AF-T	62
TABELA 6 - ACHADOS DE EXAME CLÍNICO DOS PACIENTES DO GRUPO AF-T ...	62
TABELA 7 - HÁBITOS DOS PACIENTES DO GRUPO CONTROLE	64
TABELA 8 - ACHADOS DE EXAME FÍSICO DOS PACIENTES DO GRUPO CONTROLE	65
TABELA 9 - DISTRIBUIÇÃO DOS HÁBITOS NOS GRUPOS DE ESTUDO	70
TABELA 10 - DISTRIBUIÇÃO DAS LESÕES OBSERVADAS AO EXAME FÍSICO NOS GRUPOS DE ESTUDO	70
TABELA 11 - DISTRIBUIÇÃO DOS HÁBITOS NOS GRUPOS DE ESTUDO.....	73
TABELA 12 - DISTRIBUIÇÃO DAS LESÕES OBSERVADAS AO EXAME FÍSICO NOS GRUPOS DE ESTUDO	73

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MODO DE HERANÇA ENTRE PORTADORES DE GENE AUTOSSÔMICO RECESSIVO	19
FIGURA 2 – FALANGES EXTRANUMERÁRIAS	21
FIGURA 3 – TESTE CITOGENÉTICO COM DIEPOXIBUTANO. A) GAPS, B) QUEBRAS, C) DELEÇÃO, D) TRIRADIAL, E) QUADRIRADIAL, F) VÁRIAS QUEBRAS E FIGURAS RADIAIS, G) CROMOSSOMO DICÊNTRICO	27
FIGURA 4 - DIASTEMA INTERINCISIVO EM INDIVÍDUO COM AF	32
FIGURA 5 - LEUCOPLASIA EM LÍNGUA DE INDIVÍDUO COM AF	34
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DO GENOMA DO HPV	37
FIGURA 7 - KIT ABBOT PARA EXTRAÇÃO DE DNA	47
FIGURA 8 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO ESTADO DE ORIGEM DOS PACIENTES DO GRUPO AF-NT	54
FIGURA 9 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO ESTADO DE ORIGEM DOS PACIENTES DO GRUPO AF-NT	55
FIGURA 10 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO ESTADO DE ORIGEM DOS PACIENTES DO GRUPO AF-T	59
FIGURA 11 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO ESTADO DE ORIGEM DOS PACIENTES DO GRUPO AF-T	60
FIGURA 12 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO ESTADO DE ORIGEM DOS PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI	68
FIGURA 13 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DAS REGIÕES DE ORIGEM DOS PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI	69
FIGURA 14 – LESÃO BRANCA EM LÍNGUA DE INDIVÍDUO COM AF	71
FIGURA 15 - EXEMPLO DE RESULTADO VÁLIDO	80

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DA IDADE DOS PACIENTES DO GRUPO AF-NT.....	52
GRÁFICO 2 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DE ESCOLARIDADE DOS PACIENTES DO GRUPO AF-NT	53
GRÁFICO 3 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DA IDADE DOS PACIENTES DO GRUPO AF-T	58
GRÁFICO 4 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DE ESCOLARIDADE DOS PACIENTES DO GRUPO AF-T.....	58
GRÁFICO 5 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DA IDADE DOS PACIENTES DO GRUPO CONTROLE	63
GRÁFICO 6 – DISTRIBUIÇÃO DE ESCOLARIDADE DOS PACIENTES DO GRUPO CONTROLE	64
GRÁFICO 7 – DISTRIBUIÇÃO DAS MEDIANAS DE IDADE NOS GRUPOS DE ESTUDO	66
GRÁFICO 8 – DISTRIBUIÇÃO DO SEXO DE ACORDO COM OS GRUPOS DE ESTUDO	66
GRÁFICO 9 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DE ESCOLARIDADE DOS PACIENTES NOS GRUPOS DE ESTUDO.....	67
GRÁFICO 10 – DISTRIBUIÇÃO DAS MÉDIAS DE IDADE NOS GRUPOS DE ESTUDO	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	-	Anemia Aplástica
AF	-	Anemia de Fanconi
AT	-	<i>Array Tube</i>
CAR	-	<i>Clinical Arrays Reader</i>
CEC	-	Carcinoma Espinocelular
CJ	-	Conjugado
CS	-	<i>Clart Strip</i> – Sondas Específicas
DC	-	Diluyente do conjugado
DEB	-	Diepoxibutano
DECH	-	Doença do Enxerto contra o Hospedeiro
HC	-	Hospital de Clínicas
HPV	-	Papilomavírus Humano
LMA	-	Leucemia Mielóide Aguda
PBS	-	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase
RE	-	Solução de Revelação
SH	-	Solução de Hibridação
SMA	-	Síndrome Mielóide Aguda
SMD	-	Síndrome Mielodisplásica
STMO/HC	-	Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas
TL	-	Tampão de Lavagem
TCTH	-	Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas
UFPR	-	Universidade Federal do Paraná

RESUMO

A anemia de Fanconi (AF) é uma doença geneticamente herdada de maneira autossômica recessiva caracterizada por fragilidade cromossômica e distúrbios hematológicos associados às malformações congênitas. A doença pode evoluir para anemia aplástica severa em decorrência de falência da medula óssea. Pacientes com AF têm susceptibilidade aumentada para neoplasias de cabeça e pescoço - Carcinoma Espinocelular (CEC), do trato anogenital e da cavidade bucal. Embora o tratamento eficaz para AF seja o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH), é sabido que o risco de desenvolvimento de neoplasias aumenta progressivamente após o mesmo. Recentemente, o papilomavírus humano (HPV) tem sido considerado como um agente co-carcinogênico e propõe-se a participação do mesmo na carcinogênese em AF. No presente estudo foram realizados anamnese, exame físico da boca e coleta de amostras de células epiteliais bucais por meio de bochechos com solução salina para detecção do HPV por meio da técnica de *Polimerase Chain Reaction* (PCR) em tempo real. A amostra do estudo (n = 150) foi dividida em três grupos: indivíduos com AF não transplantados (n = 50) e transplantados (n = 50) e indivíduos saudáveis (controle) (n = 50). Houve semelhança entre os grupos em relação à idade, sexo e escolaridade. Os pacientes com AF foram provenientes de 21 estados brasileiros, sendo os de maior frequência: SC (17%), PR e SP (15%) e BA (10%). A doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) foi encontrada apenas em pacientes com AF transplantados (6%, p = 0,04). Lesões leucoplásicas foram mais encontradas em pacientes transplantados (10%) do que em pacientes não-transplantados (2%) (p = 0,02) e lesões aftosas apareceram apenas em pacientes não-transplantados (6%) (p = 0,02). Observou-se apenas um caso de HPV de alto risco com genótipo não especificado. Em análise pareada para HPV de alto e baixo risco, selecionou-se 12 pacientes de cada grupo e todos os resultados foram negativos para HPV. Em conclusão, verificou-se maior frequência de lesões bucais nos pacientes com AF, mas não se observou diferença entre pacientes com AF transplantados, não transplantados e controles em relação à frequência de HPV.

Palavras-Chave: Anemia de Fanconi; Papilomavírus Humano; Reação em Cadeia da Polimerase; Boca.

ABSTRACT

Fanconi anemia (FA) is usually inherited as an autosomal recessive disorder characterized by progressive pancytopenia, congenital abnormalities and a predisposition to the development of hematological malignancies as well as squamous cell carcinoma of head and neck and anogenital region. Whereas effective treatment for the hematological complications of FA is hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), it is also known that the risk of developing cancer increases progressively thereafter. Recently, the human papillomavirus (HPV) has been considered as a co-carcinogen agent and could be involved in the carcinogenesis of FA. In the present study we performed anamnesis and physical examination of the mouth and we also collected samples of oral epithelial cells by gargling with saline for HPV detection by the polymerase chain reaction technique (PCR) in real time. The study sample (n = 150) were divided into three groups: non-transplanted patients with FA (n = 50) and transplanted patients with FA (n = 50) and healthy individuals (controls) (n = 50). There was no difference between the groups regarding age, sex and levels of education. Patients with FA were from 21 Brazilian states, with the highest frequency as follows: States of Santa Catarina (17%), Parana and Sao Paulo (15%) and Bahia (10%). There was no difference in the frequency of caries and gingivitis among study groups ($p > 0.05$). The identification of Graft versus host disease (GVHD) was found only in transplanted FA patients. Leukoplakic lesions ($p = 0.02$) were found more frequently in transplanted patients (10%) than non-transplanted patients (2%) and aphthous lesions appeared only in non-transplant patients (6%) ($p = 0.02$). It was found only one case of high-risk HPV genotype unspecified. In paired analysis for HPV high and low risk, we selected 12 patients in each group and all results were negative for HPV. In conclusion, A higher frequency of oral lesions were identified in patients with FA but no difference was observed between transplanted , non transplanted patients and healthy controls regarding the presence of HPV.

Keywords: Fanconi Anemia; Human Papillomavirus; Polymerase Chain Reaction; Mouth.

1 INTRODUÇÃO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença genética rara, descrita pela primeira vez pelo pediatra suíço Guido Fanconi, em 1927, que investigou três irmãos que apresentavam anemia aplástica com evolução muito rápida e fatal (FANCONI, 1927¹ apud BUTTURINI *et al.* 1994). Apresenta como características clínicas malformações esqueléticas, hipogonadismo, retardo de crescimento, microcefalia e manchas de hiperpigmentação na pele, ocorrendo na primeira década de vida (BUTTURINI *et al.* 1994; KUTLER *et al.*, 2003a).

O diagnóstico clínico da AF, devido à grande variedade fenotípica, exige a complementação diagnóstica através de métodos laboratoriais (FAIVRE *et al.*, 2000). A AF se caracteriza pela instabilidade cromossômica espontânea e a hipersensibilidade das células dos pacientes ao efeito indutor de quebras cromossômicas de agentes clastogênicos, tais como a mitomicina C (MMC) e o diepoxibutano (DEB). Com base nisto, desenvolveu-se métodos de indução de quebras cromossômicas, como o Teste de Sensibilidade ao DEB, que atualmente é o método de referência para o diagnóstico da AF (SAGASETA *et al.*, 2003; AUERBACH, 2009).

Do ponto de vista clínico caracteriza-se por pancitopenia - falência progressiva da medula óssea e pela predisposição ao desenvolvimento de neoplasias malignas, como a leucemia e os tumores sólidos (PASQUINI, 2000; ALTER; GREENE; VELASQUEZ, 2003; ROSENBERG *et al.*, 2005).

Na AF, a falência de medula óssea é tratada pelo transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). Há melhora no quadro hematológico, porém estes pacientes apresentam aumento da predisposição ao desenvolvimento de tumores sólidos, principalmente o carcinoma espinocelular (CEC) no fígado, na região de cabeça e pescoço e trato genital (LUSTIG *et al.* 1995; PASQUINI *et al.*, 2003).

¹ Fanconi G: Familiare infantile perniziösaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Kostitution). Jahrbuch Kinder 117:257, 1927.

Se comparados à população em geral, pacientes com AF apresentam de 700 a 800 vezes mais chances de desenvolvimento de alterações malignas. Portanto, é de extrema importância o diagnóstico precoce do CEC (ALTER, 2005).

Atualmente, neoplasias malignas da cavidade bucal são associadas ao HPV, principalmente o CEC. O HPV, encontrado em epitélio de mucosa bucal normal, não permite inferências precisas quanto ao papel na carcinogênese, se é um agente principal, se é coadjuvante ou somente encontra-se presente no epitélio bucal. Apesar do aprimoramento das técnicas de detecção do HPV nas lesões de mucosa bucal, seu envolvimento não foi devidamente comprovado (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Porém, considerando a prevalência do HPV em lesões associadas ao vírus, sua participação na carcinogênese não pode ser descartada (CASTRO; BUSSOLOTI, 2006).

O Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) possui um serviço de referência no atendimento aos portadores de AF - o Serviço de Transplante de Medula Óssea, que atende pacientes de todas as regiões do Brasil.

O presente estudo pretende avaliar a prevalência do HPV na mucosa bucal, bem como identificar lesões por meio de exame físico em pacientes com AF em acompanhamento clínico no HC-UFPR.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

- a) Determinar a prevalência do Papiloma Vírus Humano (HPV) em pacientes com Anemia de Fanconi.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Verificar se o HPV é mais prevalente em AF do que na população em geral;
- b) Verificar se a prevalência de HPV é influenciada pelo TCTH;
- c) Investigar se a prevalência de HPV é alterada pelo sexo, idade e hábitos dos indivíduos;
- d) Avaliar o perfil de lesões bucais HPV-induzidas e lesões precursoras de câncer bucal;
- e) Avaliar a frequência de lesões cariosas em pacientes com Anemia de Fanconi submetidos ou não ao TCTH e indivíduos controle.

Foi descrita em 1927 pelo pediatra suíço Guido Fanconi, que identificou a doença em três irmãos com diferentes malformações congênicas, astenia, infecções de repetição e sangramentos espontâneos devido a uma falha na função da medula óssea (SAGASETA *et al.*, 2003).

2.1.1 Características Clínicas e Hematológicas

Clinicamente, as manifestações da AF são variáveis, com sintomas relacionados à anemia, infecções associadas à neutropenia e sangramento relacionado à trombocitopenia (ALTAY *et al.*, 1997).

A AF apresenta-se como uma doença caracterizada por uma falência progressiva e generalizada da medula óssea (pancitopenia), fácies característica, diversas anormalidades anatômicas congênicas, retardo de crescimento e mental, hipogonadismo e predisposição a vários tipos de neoplasias, especialmente leucemias (FANCONI, 1927² apud BUTTURINI *et al.*, 1994; LIU *et al.*, 1994).

Vários sistemas do organismo podem ser afetados como: sistema nervoso central, gastrointestinal, endócrino, esquelético, cardiorrespiratório, dentre outros (GIAMPIETRO *et al.*, 1993; KUTLER *et al.*, 2003a).

As alterações congênicas mais comuns são: manchas na pele caracterizadas por hiperpigmentações do tipo "café com leite" (podendo ocorrer hiperpigmentação generalizada com escurecimento de toda a pele, resultando em um aspecto "bronzado"); anormalidades mandibular e da face, microdontia, microftalmia, microstomia, estrabismo, retardo mental, surdez ou malformações das orelhas e pregas epicânticas; malformações cardíacas e renais. Outras alterações incluem defeitos esqueléticos como: ausência do rádio e do polegar, polegar hipoplásico ou extranumerário ou de topografia anômala, sindactilia, dedos e falanges extranumerárias

² Fanconi G: Familiare infantile perniziosaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Kostitution). Jahrbuch Kinder 117:257, 1927.

(Figura 2), microcefalia, nanismo, ausência ou hipoplasia do primeiro metacarpiano, hipoplasia tenar, luxação congênita do quadril, espinha bífida e alterações endócrinas como hipodesenvolvimento gonadal (PASQUINI; ZANIS-NETO, 2004; REINHARD *et al.*, 2007; AUERBACH, 2009; SAGASETA *et al.*, 2003; D'ANDREA, 2010).



FIGURA 2 – FALANGES EXTRANUMERÁRIAS

FONTE: Disponível em <<<http://drugline.org/medic/term/fanconi-anemia>>>. Acesso em Out., 2011.

O achado mais frequente em indivíduos com AF (aproximadamente 80%) é a baixa estatura, sendo secundária à deficiências hormonais, que incluem: diminuição da função hipofisária com hipogonadismo, deficiência do hormônio de crescimento, disfunção da tireóide e deficiência ou resistência à insulina, com intolerância à glicose. Observa-se padrões de crescimento anormal tanto no período pré quanto no pós-natal, inclusive com baixo peso ao nascimento (ROSENBERG; HUANG; ALTER; GREENE; VELAZQUEZ, 2003; AUERBACH, 2009; SAGASETA, 2003). Aproximadamente 33% dos indivíduos com AF não possuem anormalidades congênitas (D'ANDREA; GROMPE, 1997).

Em relação à anormalidades do desenvolvimento gonadal e sexual, pode ocorrer hipogonadismo. Nas mulheres, pode ocorrer aplasia de útero ou da vagina, atraso na

menarca, ciclos menstruais irregulares e declínio da fertilidade. Nos homens, criptorquidia (testículos ectópicos), hipospádia (má formação congênita do meato urinário), diminuição da produção de espermatozóides e diminuição de fertilidade (AUERBACH, 2009).

São observadas anomalias otológicas nestes indivíduos, podendo envolver ou não perda auditiva. Dentre as anomalias cita-se pavilhão auditivo anormal ou ausente, orelhas proeminentes, orelhas com implantação baixa, meato auditivo pequeno ou ausente, membrana timpânica ausente e ossículos fundidos (FANCONI ANEMIA GUIDELINES FOR DIAGNOSIS AND MANAGEMENT, 2008).

Outras anormalidades podem ocorrer, como: rins ectópicos, hipoplásicos, displásicos ou ausentes, anormalidades gastrointestinais como atresia de esôfago, duodeno e jejuno, além de ânus imperfurado, fístula traqueoesofágica e também anomalias cardíacas de natureza congênita e estrutural (FANCONI ANEMIA GUIDELINES FOR DIAGNOSIS AND MANAGEMENT, 2008; AUERBACH, 2009).

Apesar de ocorrer variações em cada caso, a falência progressiva da medula óssea geralmente ocorre na primeira década de vida. Este processo se inicia com a redução dos valores hematimétricos no sangue periférico (trombocitopenia, leucopenia e anemia), sendo a medula óssea inicialmente normocelular, tornando-se progressivamente hipoplásica (GROSS *et al.*, 2002). Clinicamente, podem-se definir três graus de comprometimento medular: a) Grau I - não apresenta falha medular: caracteriza-se por contagem de plaquetas acima de $100.000/\text{mm}^3$; neutrófilos acima de $100/\text{mm}^3$; hemoglobina acima de 10g/dL ; b) Grau II – ou falha medular inicial: caracteriza-se por pelo menos um dos critérios: contagem de plaquetas entre $100.000/\text{mm}^3$ e $20.000/\text{mm}^3$; neutrófilos entre $1.000/\text{mm}^3$ e $500/\text{mm}^3$; hemoglobina menor que 10g/dL ; sem necessidade de transfusões ou até 20 transfusões; c) Grau III – ou falha medular avançada: caracteriza-se por pelo menos um dos critérios: contagem de plaquetas abaixo de $20.000/\text{mm}^3$; neutrófilos abaixo de $500/\text{mm}^3$ ou necessidade de mais de 20 transfusões de hemácias e (ou) plaquetas (BUTTURINI *et al.*, 1994; GUARDIOLA *et al.*, 2000).

O diagnóstico é realizado em média aos sete anos de idade (ALTER, 2005). Aos 48 anos de idade, 93% dos indivíduos com AF que foram submetidos ao transplante de

células tronco-hematopoiéticas (TCTH), devido à falência da medula óssea ou leucemia mielóide aguda, desenvolvem um tumor sólido ou falecem (ROSENBERG; GREENE; ALTER, GREENE, VELAZQUEZ, 2003).

Nos indivíduos com AF que não apresentam malformações congênitas, o diagnóstico geralmente é feito após o surgimento dos sintomas clínicos de disfunção hematológica, aumentando o risco de neoplasias malignas. O desconhecimento médico do espectro fenotípico da AF, muitas vezes, leva ao atraso diagnóstico e a média de idade do diagnóstico neste grupo é significativamente mais alta do que a dos indivíduos com malformações (ALTER, 2005; AUERBACH, 2009).

A evolução do paciente com AF para falência de medula óssea, malignidades hematológicas e malignidades não hematológicas aos 40 anos é, respectivamente, de 90%, 33% e 28%. A mortalidade global é de 80% aos 40 anos (SHIMAMURA *et al.*, 2002).

Há uma predisposição marcante ao desenvolvimento de neoplasias, principalmente à leucemia mielóide aguda (LMA), à síndrome mielodisplásica (SMD) e tumores sólidos (ALTER; GREENE; VELAZQUEZ, 2003; FANCONI ANEMIA GUIDELINES FOR DIAGNOSIS AND MANAGEMENT, 2008).

Relata-se que 90% dos indivíduos com AF desenvolvem anemia aplástica (AA) em média entre 8 a 10 anos de idade, ou seja, na primeira década de vida (ALTER, 1996).

A AA caracteriza-se por pancitopenia progressiva da medula óssea. Indivíduos com AF com aplasia medular apresentam redução acentuada do número de plaquetas, tendo como consequência hemorragias espontâneas. As infecções não são, habitualmente, combatidas com êxito devido à leucopenia (ALTER, 1996; PASQUINI, 2000; ROSENBERG; HUANG; ALTER, 2004).

A SMD é definida como uma anormalidade hematológica composta de um grupo de doenças hematopoiéticas de origem clonal da medula óssea caracterizada por produção e maturação de células sanguíneas que, frequentemente, culminam na deficiência de hemácias, leucócitos e plaquetas, levando à LMA (ALTER, 2005; FANCONI ANEMIA GUIDELINES FOR DIAGNOSIS AND MANAGEMENT, 2008).

Indivíduos que desenvolvem AA, LMA ou SMD em idade precoce devem ser investigados quanto à AF, mesmo sem manifestações clínicas da síndrome (ALTER, GREENE, VELAZQUEZ, 2003).

As neoplasias aparecem principalmente após os 20 anos de idade. Mulheres desenvolvem frequentemente câncer de mama, de colo de útero e vulva. A partir dos 40 anos a incidência aumenta para ambos os sexos, principalmente se fumantes, de neoplasias de cabeça, pescoço e esôfago.

Realizou-se um estudo de revisão de literatura entre os anos de 1927 e 2001, onde de 1300 indivíduos com AF, 9% desenvolveram LMA, 7% apresentaram SMD, 5% neoplasias de tecidos sólidos e 3% carcinomas hepáticos. Os indivíduos com neoplasia eram os com diagnóstico tardio da doença primária. A média de idade para o desenvolvimento de uma neoplasia foi de 16 anos, comparada com 68 anos de idade para a população em geral. Os carcinomas digestivos e ginecológicos foram as neoplasias mais frequentes (ALTER, GREENE, VELAZQUEZ, 2003).

O risco elevado de desenvolver malignidades, em especial SMD, LMA e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, deve-se ao defeito no reparo do DNA, ao defeito na detoxificação de radicais de oxigênio e à imunodeficiência, tanto primária da doença quanto decorrente da imunoterapia supressora após tratamento com transplante de medula óssea (HARRISON *et al.*, 2006; SHIMAMURA, 2006; VEIGA, 2009). As células apresentam sensibilidade aumentada a mutágenos como radiação e agentes alquilantes. A imunodeficiência pode atuar tanto como uma consequência primária da doença ou como uma complicação da terapia imunossupressora pós-TCTH. A imunidade humoral tem sido relatada como normal nestes pacientes, com porcentagem e número de linfócitos B normais ou muito próximo à normalidade, e ainda IgG e IgM do soro, assim como IgA e IgE, normais (PASQUINI; ZANIS-NETO, 2004).

O risco de desenvolvimento de LMA em indivíduos com AF é 785 vezes maior que em indivíduos saudáveis, assim como o desenvolvimento de neoplasias na região de cabeça, pescoço, trato gastrointestinal e genital (ROSENBERG; HUANG; ALTER, 2004).

2.1.2 Epidemiologia

Indivíduos de todas as etnias: caucasianos, afro-descendentes, asiáticos, hispânicos, índios asiáticos e ameríndios podem apresentar AF (SWIFT, 1971³ apud VEIGA, 2009). O diagnóstico, na maioria das crianças, é realizado entre 6 e 9 anos de idade (75%) sendo em média de 6,5 anos para meninos e de 8,0 anos para meninas, embora haja relatos também desde o nascimento até 48 anos (SAGASETA *et al.*, 2003; SHIMAMURA, 2006).

Na maioria das populações, já estudadas, a prevalência de AF é de aproximadamente um em cada cem mil indivíduos nascidos vivos. Nos Estados Unidos, Europa e Japão, a frequência estimada de portadores é de 1:300 (D'ANDREA; GROMPE, 1997). Na Turquia, em 1997, estimou-se frequência de 1:300 a 1:600 (ALTAY *et al.*, 1997). Recentemente, observou-se maior frequência de indivíduos com AF nos Estados Unidos, 1:181. Em 2010 a estimativa foi de 550 a 975 indivíduos com AF vivendo nos EUA, com nascimento de 31 crianças portadoras de AF ao ano (ROSENBERG; TAMARY; ALTER, 2011).

A sobrevida de indivíduos com AF observada em estudo realizado entre 1981 e 1990 nos EUA foi de 19 anos. A sobrevida média aumentou para 30 anos em estudo realizado entre 1991 e 2000, graças aos avanços no tratamento e conhecimento da fisiopatologia da doença (TANIGUCHI; D'ANDREA, 2006).

Entre os sexos, a AF apresenta distribuição igualitária. Porém, isto não é um consenso, pois alguns autores encontraram maior prevalência no sexo feminino (ALTER, 2005).

³ Swift, MR. Fanconi's anaemia in the genetics of neoplasia. *Nature*. 1971; 230:370-373, 1971.

2.1.3 Exames Laboratoriais e Diagnóstico

A presença de AF deve ser considerada em qualquer indivíduo que apresente malformações congênitas comuns à doença, citopenias inexplicadas, AA, SMD, LMA, macrocitose inexplicada ou um irmão afetado. Deve também ser considerada em indivíduos com apresentações incomuns de neoplasias em idade precoces ou uma história familiar de predisposição a mesma (SHIMAMURA, 2006).

Os achados laboratoriais variam muito conforme a idade de evolução da doença, que varia de meses a anos para desenvolvimento de uma citopenia, sendo essa em média de aproximadamente 7 anos. Os indivíduos com AF inicialmente apresentam uma ligeira a moderada trombocitopenia, que pode ser confundida com púrpura trombocitopênica idiopática. A apresentação também pode se dar inicialmente com uma leucopenia ou anemia, geralmente macrocítica. Cerca de 70% das crianças com AF terá falência de medula óssea aos 10 anos. A eletroforese de hemoglobina geralmente mostra uma concentração aumentada de hemoglobina F, consistente com o estresse da eritropoiese (SHIMAMURA, 2006).

Os testes citogenéticos para confirmação diagnóstica são baseados na instabilidade cromossômica espontânea e na hipersensibilidade das células do portador de AF ao efeito indutor de quebras cromossômicas de agentes clastogênicos como a Mitomicina C (MMC) e o Diepoxibutano (DEB). Esses agentes alquilantes, quando adicionados à cultura celular de linfócitos, induzem a um aumento de quebras e formação de figuras radiais características da doença, sendo o Teste de Sensibilidade ao DEB o método de referência para diagnóstico da AF (Figura 3) (VEIGA, 2009).

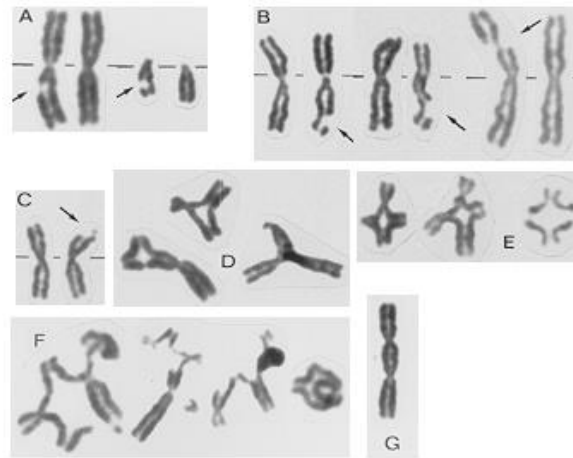


FIGURA 3 – TESTE CITOGENÉTICO COM DIEPOXIBUTANO. A) GAPS, B) QUEBRAS, C) DELEÇÃO, D) TRIRADIAL, E) QUADRIRADIAL, F) VÁRIAS QUEBRAS E FIGURAS RADIAIS, G) CROMOSSOMO DICÊNTRICO

NOTA: Figuras complexas G-dicêntricas

FONTE: ATLAS OF GENETICS AND CITOGENETICS IN ONCOLOGY AND HAEMATOLOGY (Disponível em <<<http://www.atlasgeneticsoncology.org/>>> Acesso em Janeiro de 2013).

Testes genéticos moleculares complementares podem ser feitos para identificar o gene da AF com mutação. Essa identificação facilita estudos futuros específicos de cada mutação com relação ao prognóstico e evolução da doença. Além disso, feito o diagnóstico de qual gene está envolvido, pode-se detectar a mutação em familiares e até mesmo fazer seu diagnóstico pré-natal (SAGASETA *et al.*, 2003).

É frequente observar mais de uma criança afetada na família. Todos os irmãos devem ser testados para a doença, pois o fenótipo é variável dentro das famílias e as manifestações clínicas podem ser muito diferentes entre eles. Em família com histórico de AF, pode-se fazer o diagnóstico pré-natal da doença por exame de fragilidade cromossômica de células das vilosidades coriônicas, amniocentese ou cordocentese. Está indicado nos casos em que o feto tem 25% ou mais de chance de ter doença (SHIMAMURA, 2006).

2.1.4 Tratamento

Tendo em vista a grande complexidade das manifestações clínicas na AF, o tratamento é multidisciplinar, visando acompanhar e melhorar a qualidade de vida daqueles afetados pela doença (FANCONI ANEMIA GUIDELINES FOR DIAGNOSIS AND MANAGEMENT, 2008).

Assim que o diagnóstico é confirmado, recomenda-se uma avaliação detalhada de vários sistemas: endócrino, oftalmológico, otorrinolaringológico, genitourinário e gastrointestinal, a fim de identificar as malformações comumente associadas à doença, tratando-as na medida do possível, acompanhando-as no decorrer dos anos e realizando diagnósticos diferenciais pertinentes (SHIMAMURA *et al.*, 2002).

A transfusão de plaquetas é indicada em pacientes com hematomas graves, hemorragias ou se forem submetidos à procedimentos cirúrgicos invasivos. Em pacientes com neutropenia e febre deve-se realizar cultura para investigar infecção, iniciar antibioticoterapia de amplo espectro até resolução da febre ou até a cultura negativar. Não há estudos que comprovem a eficácia de antibióticos profiláticos, e seu uso pode aumentar o risco de infecções fúngicas e resistência bacteriana (MEDEIROS; PASQUINI, 2010).

Para tratamento de falência medular, podem ser utilizados andrógenos e fatores de crescimento. Seus benefícios são melhorar a anemia, a trombocitopenia e a neutropenia. Podem ser mais efetivos se iniciados antes da falha completa da medula óssea. Porém, muitos indivíduos com AF tornam-se refratários a estes tratamentos, sendo o TCTH o tratamento de escolha (SAGASETA *et al.*, 2003; ALTER, 2005).

A terapia pode ser suportiva ou para reversão da falha da medula óssea. O único tratamento com perspectiva de cura é o TCTH, tendo como indicações citopenia de risco (neutropenia), pancitopenia e aumento da necessidade transfusional (MEDEIROS; PASQUINI, 2010).

O tratamento de suporte para os pacientes com falência medular concentra-se no uso de terapia androgênica ou terapia com fatores de crescimento hematopoiéticos,

para estimular a medula óssea e transfusões sanguíneas, para reposição dos derivados de sangue (MEDEIROS; PASQUINI, 2010).

O TCTH apresenta melhores resultados se realizado na fase de aplasia no paciente que tenha recebido poucas transfusões e que tenha um irmão totalmente compatível (HLA idêntico com ausência comprovada de AF). Nos indivíduos com mielodisplasia e leucemia os resultados são inferiores, porém o TCTH ainda é o tratamento de escolha, sendo associado, então, à radioterapia ou outras drogas, a fim de obter melhores resultados (MEDEIROS; PASQUINI, 2010).

O TCTH é o único tratamento com capacidade de restaurar a hematopoiese normal, bem como apresentar caráter curativo para a insuficiência medular. A sobrevida após transplante é de 70% (SOCIÉ *et al.*, 1991; ALTER, 1996; PASQUINI; NETO, 2004).

O TCTH consiste na infusão venosa de células retiradas da medula óssea, sangue periférico ou do cordão umbilical. Pode ser realizado através de um doador aparentado, chamado de transplante alogênico aparentado ou por um doador não aparentado denominado de transplante não-aparentado. O TCTH alogênico aparentado é a melhor terapia disponível para a cura da AF, pela sua alta compatibilidade de genótipos e menor taxa de desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). Em caso de ausência de um doador histocompatível na família é indicado o TCTH através de um doador não aparentado após avaliação criteriosa (SAGASETA *et al.*, 2003; FANCONI ANEMIA GUIDELINES FOR DIAGNOSIS AND MANAGEMENT, 2008). A decisão de realizar o TCTH HLA não idêntico deve ser individualizada de acordo com a compatibilidade do HLA encontrado, a refratariedade aos medicamentos, a dependência de transfusões sanguíneas e a evidência de leucemia ou SMD (SHIMAMURA *et al.*, 2002).

O TCTH promove a cura da aplasia medular, porém observa-se um aumento da incidência de tumores secundários e neoplasias malignas na evolução, desde que os indivíduos tenham sobrevida suficiente para desenvolvimento dos mesmos. Além disso, a imunossupressão prolongada, irradiação corpórea, o tratamento com ciclofosfamida e a DECH crônica podem ser fatores de risco adicionais (SOCIÉ *et al.*, 1998).

Sabe-se que a AF predispõe ao desenvolvimento de neoplasias malignas. Além disso, relata-se que, após o TCTH, o desenvolvimento de tumores sólidos aumenta, devido à associação existente entre o condicionamento pré-TCTH, a imunossupressão pós-TCTH, a instabilidade cromossômica e a insuficiência da medula óssea inerente à AF (DEEG *et al.*, 1996; KUTLER *et al.*, 2003b; SALUM *et al.*, 2006).

O TCTH diminui o risco de neoplasias linfóides, porém aumenta progressivamente o risco de desenvolvimento de tumores sólidos (PASQUINI *et al.*, 2003).

Pacientes com AF que não foram submetidos ao TCTH tem média de idade de 26 anos para desenvolvimento de neoplasias de cabeça e pescoço, enquanto que para pacientes submetidos ao TCTH esta média é de 21 anos. O intervalo entre o TCTH e desenvolvimento de neoplasias malignas é de 2 a 15 anos (ALTER, 2005).

Indivíduos com AF que não foram submetidos ao TCTH apresentam um risco 30 vezes maior de desenvolver Carcinoma Espinocelular (CEC); em contrapartida, pacientes que passaram por TCTH apresentam um risco 66 vezes maior em desenvolvê-lo, se comparado a população em geral (ROSENBERG *et al.*, 2005).

Após o TCTH não há eliminação total do risco de transformação maligna devido à possibilidade de permanência de células residuais da AF (ALTER; GREENE; VELAZQUEZ, 2003).

Em decorrência do aumento do número de doadores e criação de novos protocolos, a sobrevida de indivíduos com AF aumentou. Consequentemente, os pacientes chegam a idades mais avançadas, em que a incidência de tumores sólidos aumenta consideravelmente (AUERBACH, 2009).

Na literatura, a relação que existe entre TCTH e neoplasias em indivíduos com AF é evidente. Todavia, a modificação do condicionamento para TCTH para esses indivíduos mostrou bons resultados, 44% dos transplantados sobrevivem sem apresentar CEC por dez anos ou mais (SOCIÉ *et al.*, 1991; JANSISYANONT; PAZOKI; ORD, 2000; ROSENBERG *et al.*, 2005).

Complicações oculares, endócrinas, gastrointestinais, neurossensoriais, neuromotoras e bucais ocorrem frequentemente em indivíduos submetidos ao TCTH com sobrevida longa (BAKER *et al.*, 2004).

Os efeitos tardios relacionados a indivíduos com AF submetidos ao TCTH tem sido cada vez mais reconhecidos, tendo em vista o aumento da sobrevida dos mesmos a partir dos anos 80 (ANELLI, 2005). Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica, neoplasias secundárias e infecções são exemplos de efeitos tardios que ocorrem após dois anos da realização do TCTH (FERRY; SOCIÉ, 2003).

Uma das complicações mais comuns após o TCTH é a DECH, que se define como um ataque das células T do doador às células do receptor. Pode apresentar diferentes graus (Grau I ao IV) de acordo com sua gravidade. Manifesta-se na forma aguda por meio de lesões na pele, olhos, mucosas, fígado, cavidade bucal e sistema gastrointestinal nos primeiros 100 dias após o TCTH e na forma crônica após este período (GUARDIOLA *et al.*, 2004).

Em um estudo com 11 indivíduos com AF que desenvolveram CEC, todos desenvolveram DECH grave após o TCTH. Estes indivíduos eram mais jovens que o habitualmente observado. Este estudo mostrou um risco 33 vezes maior de desenvolvimento de CEC pós-TCTH (ROSENBERG *et al.*, 2005).

A condição inflamatória crônica da DECH e o infiltrado linfocitário aumentam o potencial de mutações e, conseqüentemente, tornam-se fatores responsáveis pela predisposição ao CEC (PASQUINI *et al.*, 2003).

Com a melhora na disponibilidade dos transplantes hematopoiéticos, em decorrência do maior número de doadores e dos novos protocolos, a taxa de sobrevivência de indivíduos com AF aumentou. Contudo, os doentes com AF chegam a idades mais avançadas, em que a incidência de tumores sólidos aumenta consideravelmente (AUERBACH, 2009). Com o TCTH há uma redução acentuada no risco de neoplasia linfóides, porém há um aumento progressivo no risco de desenvolvimento de tumores sólidos (PASQUINI *et al.*, 2003).

2.1.5 Manifestações Bucais

a) Alterações Dentárias

Observam-se anomalias dentárias de número (presença de agenesias e dentes supranumerários), posição (presença de giroversões, transposições dentárias e diastemas) (Figura 4), dimensão e forma (raízes curvas, afiladas e com dilacerações apicais; taurodontia, microdontia e hipoplasia de esmalte) (ARAUJO *et al.*, 2007; TEKCIKEK *et al.*, 2007).



FIGURA 4 - DIASTEMA INTERINCISIVO EM INDIVÍDUO COM AF
FONTE: O autor (2014)

Devido ao déficit de hormônios de crescimento e, conseqüentemente, baixa estatura, observa-se discrepância entre a idade dentária, cronológica e óssea, cujas idades dental e óssea são inferiores a idade cronológica (KOUBIK *et al.*, 2006; SAGASETA *et al.*, 2003).

2.2.2 Alterações Periodontais

A condição sistêmica somada a pobre higiene bucal são agentes agravantes ao desenvolvimento de sangramentos gengivais, hiperemias, gengivite e periodontite nos indivíduos com AF (ENGEL; RUSKIN; HAROLD, 1992; TEKCICEK *et al.*, 2007). A trombocitopenia exacerba o sangramento gengival e a anemia crônica pode favorecer a palidez da mucosa e da gengiva (AÇIKGÖZ *et al.*, 2005).

A condição hematológica dos indivíduos com AF não interfere na presença ou ausência da doença periodontal, mas sim a condição de higiene. Os autores não encontraram uma relação direta entre a contagem plaquetária, inflamação gengival e a saúde periodontal nos indivíduos com AF (ARAUJO *et al.*, 2007).

2.2.3 Lesões Cariosas

Comuns nos jovens e adolescentes com AF, a prevalência de cárie na AF é de 35%, não demonstrando alterações microbiológicas significativas, quando comparado à população em geral (AÇIKGÖZ *et al.*, 2005; TEKCICEK *et al.*, 2007).

2.2.4 Lesões de Tecidos Moles

As lesões mais comuns encontradas na cavidade bucal nos indivíduos com AF são as úlceras aftosas recorrentes. A deficiência leucocitária, que provoca diminuição da imunidade, favorece o aparecimento destas lesões. Úlceras aftosas estão relacionadas à condição hematológica, anemia e neutropenia (OTAN *et al.*, 2004).

Há alterações de fluxo salivar (hipossalivação), devido ao uso de fármacos, independente se o paciente foi ou não submetido ao TCTH (TEKCICEK *et al.*, 2007; MATTIOLI *et al.*, 2010). A hipossalivação pode acarretar em aumento na prevalência de

cárie e na predisposição ao desenvolvimento de infecções, não sendo um fator isolado (TEKCICEK *et al.*, 2007; MATTIOLI *et al.*, 2010).

A língua é o sítio de maior prevalência de lesões (69%) como leucoplasias (Figura 5), eritroplasias, líquen plano e CEC. Estas lesões possuem elevado potencial para malignização (WARNAKULASURIYA; JOHNSON; VAN DER WAAL, 2007). As alterações mais comumente encontradas na língua incluem atrofia papilar, língua saburrosa, macroglossia e a pigmentação melânica (OPINYA; KAIMENYI; MEME, 1988; TEKCICEK *et al.*, 2007).



FIGURA 5 - LEUCOPLASIA EM LÍNGUA DE INDIVÍDUO COM AF
FONTE: O autor (2014)

DECH é encontrada comumente na mucosa bucal após a realização do TCTH. Rosenberg *et al.* (2005) observaram que cerca de 96% dos indivíduos com AF que desenvolveram DECH aguda morreram ou desenvolveram neoplasia maligna seis anos após o transplante.

2.2.4.1 CEC na Cavidade Bucal

O CEC é a neoplasia que mais acomete os pacientes com AF. Pode ser encontrado em região de cabeça e pescoço, região anal, vulva e esôfago, porém é mais predominante na cavidade bucal. Pode ainda ser encontrado em revestimento mucoso

do trato aéreo-digestivo superior, nasofaringe, orofaringe, laringe ou hipofaringe (SOARES *et al.*, 2007; ALTER, 2005; KUTLER *et al.*, 2003a; ASLAN, 2006). Aproximadamente 65% dos CEC situam-se na cavidade bucal (FANCONI ANEMIA GUIDELINES FOR DIAGNOSIS AND MANAGEMENT, 2008) e as regiões mais afetadas são: língua, rebordo alveolar, região retromolar, assoalho e mucosa bucal (KUTLER *et al.*, 2003b; MASSEROT *et al.*, 2008).

A incidência de CEC de língua é de 69%, sendo a margem da língua o local de maior incidência em crianças (LUSTIG *et al.*, 1985). Na população em geral, a proporção de CEC de língua é de 10 a 20% (KUTLER *et al.*, 2003b).

Na AF, o CEC é extremamente agressivo, com metástases linfonoidais e invasão de tecidos moles, além de surgir precocemente em relação a população em geral (KUTLER *et al.*, 2003b; ASLAN, 2006). O CEC ocorre em média aos 26 anos de idade, passando a ocorrer em média aos 21 anos nos indivíduos que foram submetidos ao TCTH, sendo que aos 48 anos o risco cumulativo de um indivíduo com AF desenvolver uma neoplasia é de 78% (ALTER; GREENE; VELAZQUEZ, 2003).

O CEC está diretamente relacionado ao TCTH. Alguns autores consideram que indivíduos com AF transplantados desenvolvem CEC mais precocemente do que indivíduos não transplantados (ALTER; GREENE; VELAZQUEZ, 2003; ROSENBERG; GREENE; GUARDIOLA *et al.*, 2004). Explica-se esta relação por fatores inerentes a AF: instabilidade cromossômica, predisposição à neoplasias malignas e fatores relacionados ao preparo para o TCTH e pós-TCTH, ou seja, terapia imunossupressora e irradiação corporal (LUSTING *et al.*, 1995; DEEG *et al.*, 1996; MILLEN *et al.*, 1997; GUARDIOLA *et al.*, 2004). Fatores hormonais também podem estar associados ao desenvolvimento de CEC. Neoplasias malignas no sexo feminino tem predominância maior (2:1) se comparados às demais alterações neoplásicas associadas a síndrome (PASQUINI *et al.*, 2003; ALTER, 2005).

2.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus pertencente a família *papillomaviridae*, gênero *papovaviridae* e possui uma dupla cadeia de DNA circular com aproximadamente oito mil pares de bases. É um vírus pequeno, não envelopado e o genoma possui seus genes codificados. Possui capsídeo icosaédrico com um diâmetro de 50nm a 60nm, não revestido por envelope lipídico. Possui 72 capsômeros e determinantes antigênicos espécies específicos na superfície externa e interna. Replicam seus genomas dentro do núcleo das células do hospedeiro, sendo então partículas intracelulares obrigatórias, com tropismo específico para os ceratinócitos (COLLIER *et al.*, 1998; IARC, 2007; FERRARO *et al.*, 2011).

O genoma do HPV é dividido em regiões E (*early* – que codifica proteínas produzidas inicialmente e L (*late* - que codifica proteínas produzidas após a região E). A região E representa 45% e a região L representa 50% do genoma, contendo também as regiões denominadas fase aberta de leitura: E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 e L2. O gene E1 está relacionado à manutenção e replicação do DNA; E2 relaciona-se a transcrição e E4 codifica uma proteína que destrói a queratina citoplasmática, produzindo imagem de um halo de coilocitose; L1 e L2 codificam as proteínas do capsídeo viral e E5, E6 e E7 relacionam-se à transformação e degradação celular. Entre as regiões E e L, está a região não codificadora denominada LCR (*long control region*) ou URR (*upstream regulatory region*), representando 15% do genoma viral envolvido no controle da expressão dos genes virais (BETTINI *et al.*, 2003) (Figura 6).

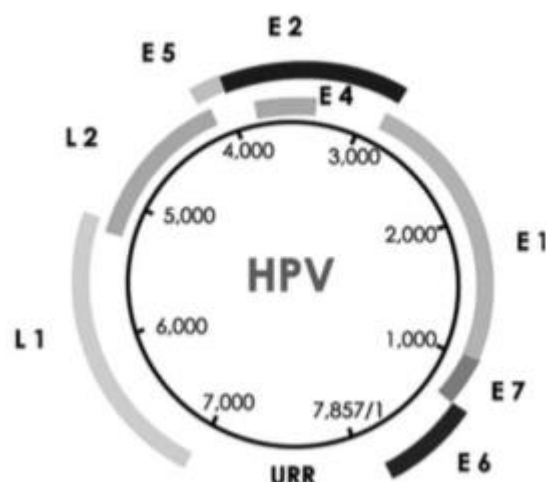


FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DO GENOMA DO HPV

FONTE: Kettler *et al.* (1999)

O HPV tem sua família representada por 100 genótipos. Classificados a partir da célula epitelial infectada, dividem-se em mucosos, que infectam a mucosa bucal, respiratória e genital, e cutâneos; e quanto à transformação maligna em alto e baixo risco (IARC, 2007). Os HPVs considerados de baixo risco são: HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70 e 81 e estão associados a lesões benignas. Os de alto risco são: HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82, estão associados a lesões malignas (RAGIN; MODUGNO; GOLLIN, 2007; IARC, 2007). Estes tipos virais de alto e baixo risco diferenciam-se de acordo com a capacidade de transformação das oncoproteínas codificadas pelos genes E6 e E7, que se ligam às proteínas p53 e pRB, reguladoras do ciclo celular, consideradas supressoras do câncer. Este fenômeno causa o desbloqueio do ciclo celular e instabilidade genética, o que provoca alterações genéticas adicionais que levam ao câncer, por impedirem a apoptose, causando o fenômeno de imortalização celular. Este processo é encontrado somente nos vírus de alto risco (SALVIA, 2004).

A exposição imunológica ocorre por meio de mecanismos existentes na camada epitelial, não ultrapassando a camada basal. A membrana celular infectada expressa

somente a proteína E5, e esta pequena quantidade de antígenos virais de superfície pode permitir a atenuação da resposta imune. A E5 se liga e inativa a proteína necessária para processar antígenos. Como a célula epitelial não é boa apresentadora de antígenos, o HPV permanece dentro dela sem ser reconhecido pelo sistema imunológico. Devido ao fato do HPV não causar lise ou morte da célula do hospedeiro, o vírus permanece isolado do contato de células do sistema imune, que iniciaria o processo de reconhecimento. A infecção viral pode gerar lesões clínicas de forma localizada, subclínica ou latente (PEIXOTO, 2006).

O HPV segue o ciclo viral fazendo: adsorção, penetração, transcrição, tradução, replicação do DNA e maturação. Mas, em alguns casos, esse processo não chega a acontecer completamente, uma vez que o vírus pode integrar-se ao genoma das células hospedeiras e induzir à carcinogênese das mesmas. Nas lesões benignas, o vírus está na forma circular, chamada epissomal, não integrado ao genoma da célula hospedeira, e em grande número de cópias. Nas lesões malignas, apresenta-se na forma integrada ao genoma da célula hospedeira. Entretanto, é possível encontrar formas epissomais nas células malignas e, uma vez estando integrado, o vírus não pode ser revertido à sua forma epissomal (CAVALCANTI; CARESTIATO, 2006).

A presença na mucosa bucal dos tipos anogenitais, HPV 6/11 e 16/18, poderia significar transmissão orogenital, o que tornaria este vírus um importante cofator no desenvolvimento do câncer bucal, assim como é considerado no colo uterino. A prevalência de HPV na mucosa bucal, macroscopicamente normal, é muito variável na literatura: varia de 0 a 81,1%, com média de 10% (TRISTÃO *et al.*, 2012). Nem sempre as infecções são visíveis macroscopicamente. Assim, a infecção pelo HPV pode ser classificada em: a) latente, a qual só pode ser diagnosticada por métodos de biologia molecular; b) subclínica, na qual não há sintomas clínicos, mas há alterações sutis que podem ser detectadas por métodos diagnósticos, como peniscopia, colpocitologia, colposcopia e (ou) biópsia; c) clínica, na qual há lesões evidentes ao exame clínico. Não se sabe, do ponto de vista molecular, como uma infecção por HPV permanece latente e outra, por outro lado, evolui para lesão macroscópica decorrente de intensa replicação viral (TRISTÃO *et al.*, 2012).

O processo de transmissão do HPV para a mucosa bucal ainda não está bem esclarecido. Acredita-se que possa ocorrer através da auto-inoculação, parto vaginal e prática de sexo oral, infectando epitélios por meio de abrasões e microlacerações da pele e da mucosa, permitindo assim o acesso do vírus (ZUR, 1996; FREDERICKS *et al.*, 1993).

A patogênese de displasias e neoplasias malignas e sua relação com a etiologia do vírus HPV bucal ainda não são bem explicadas (MILLER; JOHNSTONE, 2001). Ragin, Modugno e Gollin (2007) encontraram na mucosa bucal vinte e quatro tipos de HPV: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, **16, 18**, 30, **31**, 32, **33, 35, 45, 52**, 55, 57, **59**, 69, 72 e **73**. Os marcados em negrito são os considerados de alto risco, os demais, baixo risco.

Clinicamente, as lesões bucais causadas pelo vírus HPV são: papiloma escamoso, verruga vulgar, condiloma acuminado e hiperplasia epitelial focal. São lesões benignas do epitélio escamoso estratificado, tem origem epitelial, crescimento acima da superfície, são assintomáticas, podem regredir espontaneamente e (ou) apresentar recidiva. As lesões apresentam áreas brancas puntiformes ou extensas, podem ser pediculadas ou sésseis e a superfície pode variar de finamente granular à papilar (TRISTÃO *et al.*, 2012).

Segundo Bosch *et al.* (2002) a infecção por HPV de baixo e alto risco, em sua maioria (70 a 90%) é assintomática e regride espontaneamente em dois anos, sem deixar sequelas.

Entre o desenvolvimento de uma lesão e a infecção o período de latência é variável, sugerindo que outros co-fatores (tabagismo, comportamento sexual, imunidade, predisposição genética, nível socioeconômico, virulência e infecções sexualmente transmissíveis concomitantes) possam estar atuando. O acesso das partículas virais até camadas mais profundas, infectando células basais do epitélio genital, são facilitadas quando há presença de microtraumatismos (CASTELLSAGUE; BOSCH; MUNOZ, 2002).

O intervalo entre a aquisição da infecção pelo HPV e a progressão para o carcinoma geralmente acontece em 10 ou mais anos (GLOBOCAN, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional, analítico, transversal, de coleta de dados prospectiva.

3.2 LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO

O estudo foi realizado no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas (STMO/HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), no período de março de 2010 a agosto de 2012. As análises das amostras foram realizadas no Laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas (HC) de Curitiba, Paraná.

3.3 GRUPO DE ESTUDO

3.3.1 Casuística

Os pacientes que constituíram a amostra do estudo foram selecionados no STMO/HC, serviço de referência para atendimento de pacientes com AF no Brasil e que atualmente acompanha aproximadamente 500 pacientes com a doença.

3.3.2 Critérios de Inclusão

Todos os pacientes foram elegíveis para o estudo, à exceção daqueles com idade inferior a três anos, por dificuldades no procedimento de coleta.

3.3.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os casos cuja amostra não permitiu extração suficiente de DNA para análise (idade inferior a 3 anos).

3.3.4 População de Estudo

Considerando os critérios de inclusão e exclusão, constituíram a população de estudo todos os pacientes com AF com idade superior a três anos acompanhados no STMO/HC.

3.3.5 Amostra e Técnica de Amostragem

Constituíram a amostra de estudo 100 pacientes com AF distribuídos em dois grupos:

- Grupo A (n = 50): indivíduos com AF não submetidos ao TCTH;
- Grupo B (n = 50): indivíduos com AF submetidos ao TCTH.

A técnica de amostragem utilizada foi do tipo não probabilística, de conveniência e sistemática, obedecendo aos critérios de inclusão, por ordem de comparecimento às consultas, nas terças-feiras (dia da semana reservado ao atendimento desses pacientes no STMO/HC).

3.4 GRUPO CONTROLE

3.4.1 Casuística

Os pacientes que constituíram a amostra foram selecionados em consultório odontológico particular da pesquisadora que atende aproximadamente 200 pacientes por mês.

3.4.2 Critérios de Inclusão

Foram incluídos no grupo controle pacientes sem AF atendidos no consultório particular da pesquisadora seguindo critério de pareamento com o grupo de estudo de acordo com idade, sexo e contato físico (beijo e relação sexual).

3.4.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os casos cuja amostra não permitiu a extração de DNA suficiente para análise.

3.4.4 População de Estudo

Considerando os critérios de inclusão e exclusão, constituíram a população de estudo os pacientes do consultório particular da pesquisadora com idade superior a três anos, que preencheram o critério de pareamento atendidos no período de estudo.

3.4.5 Pareamento

Para o pareamento, o primeiro critério utilizado foi o sexo, seguido pela idade, com uma margem de um ano para mais ou para menos e a ocorrência ou não de contato físico (beijo ou relação sexual).

3.5 HIPÓTESE

Considerando o tipo de estudo e sua hipótese caracteristicamente associativa, a hipótese de nulidade supõe que a frequência de HPV é semelhante entre os pacientes com e sem AF. A hipótese alternativa, o inverso. Igualmente a hipótese de nulidade, considerando os subgrupos com e sem TCTH, supõe que a frequência de HPV é semelhante entre os grupos. A hipótese alternativa, o inverso.

3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Considerando a hipótese associativa a AF constituiu-se na variável explicativa ou independente principal e a variável infecção pelo HPV como variável dependente ou de desfecho.

3.7 PROCEDIMENTOS

Os pacientes foram convidados a participar do estudo e solicitou-se aos mesmos, ou quando menor de idade, aos seus responsáveis, a leitura do TCLE e assinatura. O documento foi anexado à ficha clínica elaborada para coleta de dados (Anexo 3).

Os pacientes foram examinados de acordo com as normas de biossegurança nos consultórios odontológicos do Setor de Hematologia do HC e consultório particular da pesquisadora. Utilizaram-se equipamentos de proteção individual (EPI) - toca, gorro, máscara, avental, óculos e luvas – instrumental clínico e luz artificial para o exame físico.

Na ficha clínica, elaborada especificamente para este estudo, todos os dados coletados foram anotados, sendo estabelecida a seguinte ordem (Anexo 4).

- 1) Anamnese: Foi realizada entrevista dos pacientes pela pesquisadora para obter informações sobre os seguintes dados: Identificação dos responsáveis, procedência, idade e sexo, hábitos nocivos (uso de álcool e fumo), utilização de colutórios e realização de TCTH, relações sexuais e hábito de beijo (nos pais ou companheiros);
- 2) Análise dos dentes e condição gengival: identificação de lesões cariosas com sonda exploradora n.5 e avaliação das gengivas seguindo os critérios descritos por Castro, Moraes e Furuse (2000), que definem gengivite como “quando há presença de sangramentos, edema e (ou) eritema e não há aspecto de casca de laranja”.
- 3) Análise estomatológica: Realizada seguindo os critérios de Silva (1997), examinando-se em sequência o lábio superior e inferior, comissura labial, mucosa jugal direita e esquerda, assoalho da boca, língua, palato duro, palato mole, gengivas e orofaringe.

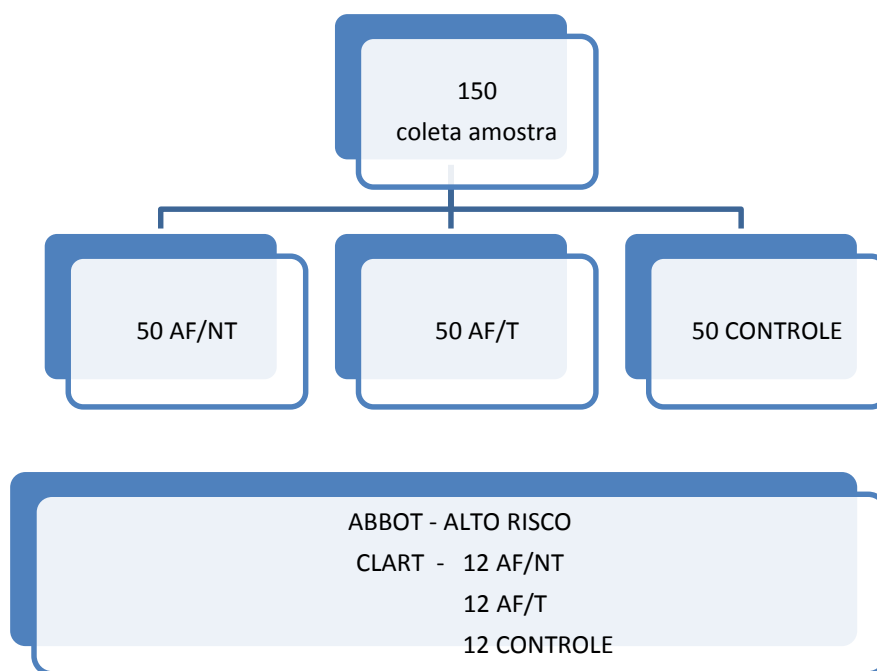
3.7.1 Coleta das Amostras

Para coleta de células bucais, utilizou-se um frasco de 50ml (DNase e RNase free), no qual se adicionou 2,5 ml de ETOH (etanol) a 100%. O paciente realizou, então, um bochecho durante 30 segundos com solução salina (NaCl 0,9%) (LENCH *et al.*, 1988; GILLISON *et al.*, 2012).

Todos os critérios de biossegurança do Laboratório de Virologia do HC/PR foram obedecidos. Imediatamente após a coleta, as amostras foram armazenadas em geladeira e no mesmo dia realizou-se o preparo inicial das mesmas, com o objetivo de permitir armazenamento adequado para posterior análise, como descrito abaixo:

- 1) Homogeneização das amostras, utilizando um agitador de tubos durante 2 segundos;
- 2) Centrifugação à 3200 rpm (rotações por minuto) durante 10 minutos;
- 3) Desprezo do sobrenadante e resuspensão do *pellet* em 10ml de *Phosphate Buffered Saline* (PBS);
- 4) Centrifugação à 3200 rpm durante 10 minutos;
- 5) Desprezo do sobrenadante e resuspensão do *pellet* em 1ml de PBS estéril;
- 6) Deste 1 ml, transferência da alíquota de 500ul a dois microtubos de 1,5ml (previamente identificados);
- 7) Congelamento das amostras a -80°C até a realização da extração do DNA.

Duas técnicas de identificação do HPV foram utilizadas: o *Abbot RealTime High Risk HPV®* e o *Clart®*. As análises das amostras seguiram as recomendações dos fabricantes (FLUXOGRAMA 1).



FLUXOGRAMA 1 – TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO UTILIZADAS
 FONTE: O autor (2014)

3.7.2 *Abbot Real Time High Risk HPV®*

O *Abbot RealTime High Risk HPV®* foi utilizado nas 150 amostras, analisando-se qualitativamente os HPVs de alto risco, com os seguintes genótipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, e 68. Este método utiliza o instrumento m2000sp Abbott, o instrumento m24sp ou o método de preparação manual da amostra para amostras de transformação e a Abbott m2000rt, instrumento para a amplificação e detecção do HPV. Uma mistura de três iniciadores destinados a uma região conservada L1 é utilizado para amplificar alvos de HPV. O sinal de 14 genótipos de HPV é gerado com a utilização de sondas fluorescentes. Controle Interno (CI) ou *amplicons* são gerados com uma cartilha para definir a segmentação de uma sequência de betaglobina endógena humana e são

detectados com a sonda CI específico. O ensaio *Abbott RealTime HR HPV* detecta a sequência de betaglobina humana endógena como controle de exemplo de validade para a adequação de células, a extração de amostras e a eficiência de amplificação. Sondas para HPV 16, HPV 18, *non*-HPV 16/18 genótipos (Outros HPV) e CI são rotuladas com fluoróforos diferentes, permitindo que seus sinais sejam distinguíveis numa única reação.

A preparação da amostra consiste em extrair, concentrar e purificar as moléculas de DNA alvo para a amplificação. A *Abbott mSample Preparation System DNA* utiliza tecnologia de partículas magnéticas para capturar os ácidos nucleicos e lavagens das partículas da amostra para remover componentes não ligados. Os ácidos nucleicos ligados são eluídos preparando a amostra para a amplificação.

O kit extração utilizando o *ABBOT mSample Preparation System DNA para RealTime High Risk HPV* possui 4 x 48 preparações e um tabuleiro de reagentes que processa 48 amostras (Figura 7).



FIGURA 7 - KIT ABBOT PARA EXTRAÇÃO DE DNA

FONTE: O autor (2014)

Todo o processamento e análise das amostras para realização do *Abbot RealTime High Risk HPV®* foi realizado por profissional especializado no Laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas – UFPR, acompanhado pela pesquisadora.

3.7.3 *Clart* Papillomavirus Humano 2

O objetivo da técnica *Clart* Papilomavirus Humano 2 (Genomica®) é o aumento significativo da sensibilidade e especificidade para aumentar a precisão diagnóstica do HPV. Este *Kit* está baseado na amplificação de fragmentos específicos do genoma e sua posterior hibridização com sondas específicas para cada tipo de HPV.

A técnica *Clart* Papilomavirus Humano 2 detecta a presença de 35 vírus HPV: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 e 89, com maior importância clínica em tipos de amostras humanas distintas (*frotis*, suspensão celular e tecido fixado em formol e incluído em parafina).

A detecção acontece mediante a amplificação de um fragmento de 450pb dentro da região L1 do vírus, por tratar-se de uma sequência que está altamente conservada entre os tipos distintos de HPV. Esta região apresenta variações suficientes para poder diferenciar cada tipo de vírus com sondas específicas. Desta maneira, assegura-se a especificidade da detecção.

A detecção do produto amplificado por PCR ocorre mediante uma nova plataforma tecnológica baseada em microarranjos de baixa densidade *Clart*® (*Clinical Array Technology*). A plataforma se fundamenta em um princípio muito eficaz que consiste em incluir um microarranjo na parte inferior de um tubo de 2 ml (*Array Tube*™-AT) ou no fundo de um poço de placa *microtiter* (*Clart*™ Strip-CS), o que simplifica todo o processo de hibridação e visualização frente aos sistemas de *arrays* clássicos.

O sistema de detecção com *Clart* Papilomavirus Humano 2 se baseia na precipitação de um produto insolúvel nas zonas de microarranjos em que se produzem a hibridização dos produtos amplificados com as sondas específicas. Durante a PCR, os produtos amplificados se marcam com biotina. Depois da amplificação, estes produtos se hibridizam com suas respectivas sondas específicas que estão imobilizadas em zonas concretas e conhecidas do microarranjo, que se une com um conjugado de estreptavidina-peroxidase. O conjugado se une através da estreptavidina com a biotina presente nos produtos amplificados, que por sua vez se encontram unidos às suas

sondas específicas, e a atividade peroxidase provoca a aparição de um produto insolúvel na presença de substrato o-dianisidina, que se precipita sobre as zonas de microarranjo, nas quais ocorre a hibridização.

Todo o processamento e análise das amostras para realização do *Clart Papillomavirus Humano 2 (Genomica®)*, foi igualmente realizado por profissional especializado no Laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas – UFPR, acompanhado pela pesquisadora

3.8 REGISTRO E GERENCIAMENTO DE DADOS

Todos os dados dos pacientes que constituíram o grupo de estudo e grupo controle foram coletados e registrados exclusivamente pelo pesquisador, imediatamente após consulta clínica no instrumento de coleta de dados (Apêndice 1). Posteriormente foram digitados em planilha eletrônica, conferidos e exportados para o *software* de estatística *Statistic* (Stasoft®), propriedade do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As medidas de tendência central e de dispersão estão expressas em médias e desvio padrão (média \pm DP) para as variáveis contínuas de distribuição simétrica e em medianas, valores mínimo e máximo (mediana, mínimo – máximo) para as de distribuição assimétrica.

A estimativa da diferença de variáveis contínuas de distribuição normal foi realizada pelo teste paramétrico, teste t de *Student* e Anova, enquanto que para variáveis de distribuição assimétrica, o teste não-paramétrico, teste de Mann-Whitney e Anova de Kruskal-Wallis.

A estimativa de diferença entre variáveis categóricas foi realizada pelos testes exato de Fisher e qui-quadrado de Pearson.

Para todos os testes foi considerado um nível mínimo de significância de 5% e poder de teste mínimo de 90%.

3.10 ÉTICA EM PESQUISA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, sob número 2063.230/2009-10 (Anexo 1). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido encontra-se no Anexo 2.

3.11 MONITORIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada considerando as medidas de proteção, minimização de riscos, confidencialidade, responsabilidade do pesquisador e da instituição, de acordo com o compromisso firmado com o Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná na ocasião de submissão do projeto.

3.12 FOMENTO PARA A PESQUISA, PROFISSIONAIS E SERVIÇOS ENVOLVIDOS

Esta pesquisa recebeu fomento do CNPq com concessão de bolsa à autora e do *Cincinatti Children's Hospital* com o fornecimento de equipamento de coleta de amostras para todos os 150 pacientes. Contou ainda com o apoio e participação do Laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas – UFPR, com o equipamento para realização de todas as análises laboratoriais e apoio da APACN para atendimento dos pacientes com Anemia de Fanconi.

4 RESULTADOS

O estudo foi conduzido com três grupos:

- GRUPO AF-NT - Constituído por pacientes portadores de Anemia de Fanconi, não submetidos ao TCTH (n = 50);
- GRUPO AF-T: Constituído por pacientes portadores de Anemia de Fanconi, submetidos ao TCTH (n = 50);
- GRUPO CONTROLE: Indivíduos sem Anemia de Fanconi e saudáveis (n = 50).

4.1 PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI

Foram estudados 100 pacientes com Anemia de Fanconi, com média de idade de $11,7 \pm 0,7$ anos, sendo 51 do sexo masculino (51%) e 49 (49%) do sexo feminino ($p = 0,38$), 98 deles (98%) solteiros. Oito (8%) apresentavam escolaridade de nível superior, 42 (42%) ensino médio, 36 (36%) ensino fundamental e em 14 casos (14%), ausente.

A maioria deles foi proveniente de Santa Catarina (17%), Paraná (15%), São Paulo (15%) e Bahia (10%). Os hábitos registrados foram: uso de álcool (2%), tabagismo (2%), uso de enxaguatórios (7%), beijo (33%), relações sexuais (7%) e uso de preservativos (6%), sem diferença em relação ao grupo controle ($p > 0,05$).

4.1.1 GRUPO AF-NT – PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI NÃO SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

Constituíram este grupo 50 pacientes portadores de Anemia de Fanconi, que não foram submetidos ao Transplante de Medula Óssea, com mediana de idade de 10,5 anos, variando de 3,0 a 35,0 anos (IC 95% = 5,5 – 20,5), sendo 29 do sexo masculino (58%) e 21 do sexo feminino (42%).

O Gráfico 1 ilustra a distribuição da idade neste grupo de estudo. Dos cinco pacientes com idade superior a 18 anos, dois eram casados.

O Gráfico 2 ilustra a distribuição da escolaridade no grupo estudado. Dos pacientes sem escolaridade dois tinham idade superior a 6 anos: um com oito anos e outro com 9 anos.

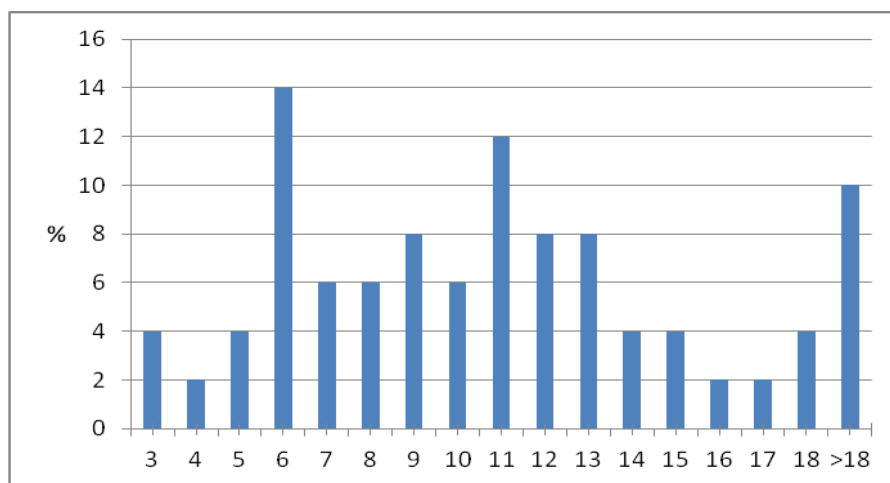


GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DA IDADE DOS PACIENTES DO GRUPO AF-NT

FONTE: O autor (2014)

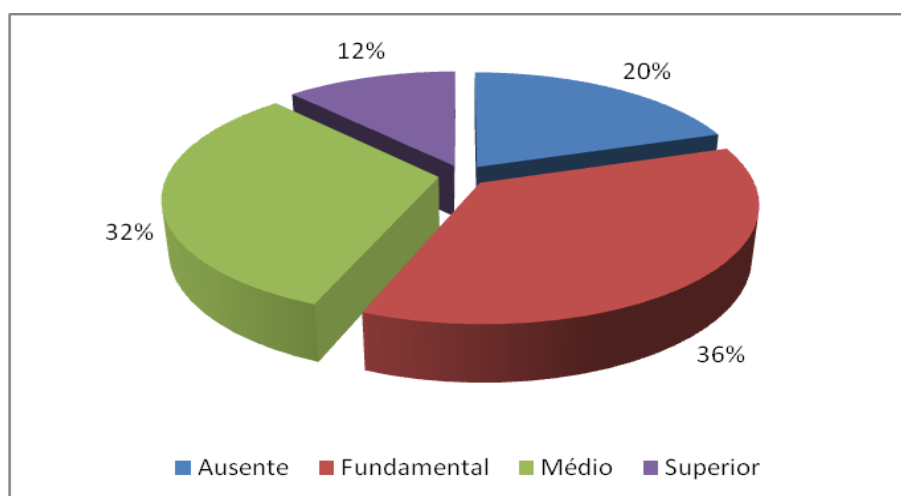


GRÁFICO 2 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DE ESCOLARIDADE DOS PACIENTES DO GRUPO AF-NT

FONTE: O autor (2014)

Os pacientes foram provenientes de 13 Estados do Brasil. Oito pacientes (16%) foram provenientes do Estado do Paraná. Os estados com maior frequência de pacientes foram: São Paulo (18%), Paraná e Bahia (16%), Santa Catarina (14%) e Amazonas (10%).

A Figura 8 ilustra a distribuição dos casos estudados em relação ao estado de origem.

A Figura 9 ilustra a distribuição dos casos estudados em relação às regiões de origem no país.



FIGURA 8 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO ESTADO DE ORIGEM
DOS PACIENTES DO GRUPO AF-NT

FONTE: O autor (2014)

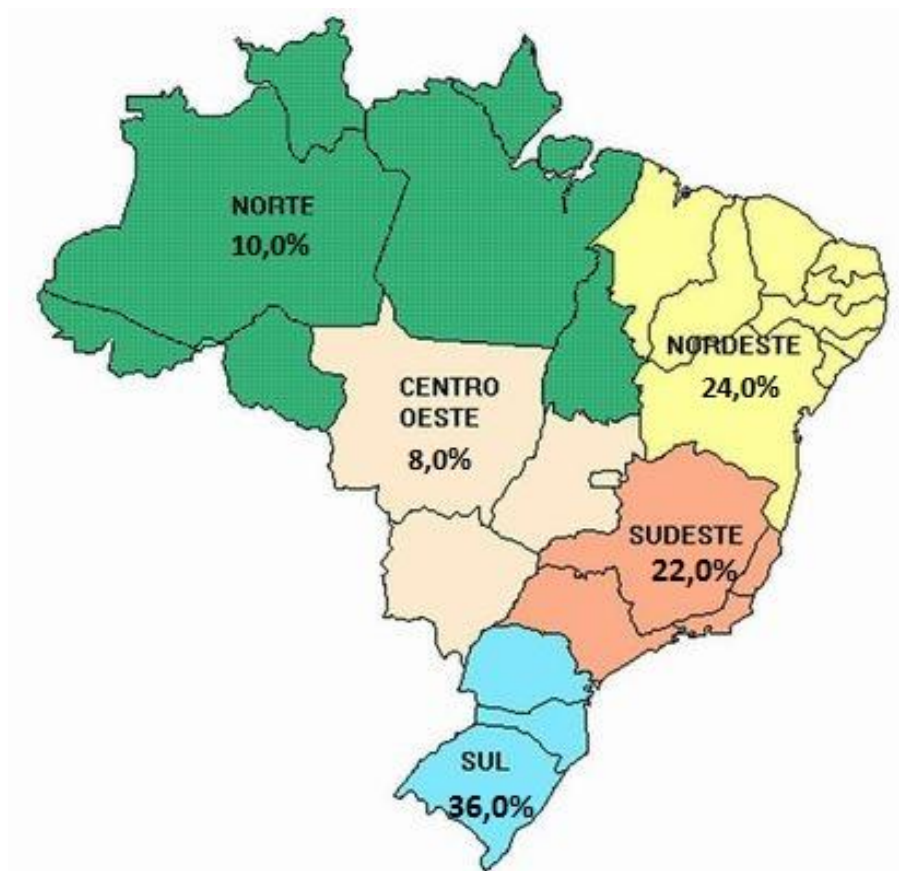


FIGURA 9 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO ESTADO DE ORIGEM
DOS PACIENTES DO GRUPO AF-NT

FONTE: O autor (2014)

Na Tabela 1 estão listadas as Cidades e respectivos Estados de origem.

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DAS CIDADES E ESTADOS DE ORIGEM DOS PACIENTES DO GRUPO AF-NT

ESTADO	CIDADES	n (%)
MG	Contagem, Paraguaçu	02 (4%)
DF	Brasília	02 (4%)
SC	Florianópolis, São João Batista	07 (14%)
BA	Salvador, Vitória da Conquista, Madre Deusa	07 (14%)
RS	Pelotas, Caxias do Sul, Cachoeira do Sul	03 (6%)
GO	Goiânia	01 (2%)
MS	Iguatemi do Sul	01 (2%)
SP	Bocaína, Barretos, Mogi das Cruzes, Laranjal Paulista, Santa Bárbara do Oeste, São Paulo	09 (18%)
PR	Ponta Grossa, Curitiba, Marmeleiro, Londrina, Ubatuba	08 (16%)
AM	Manaus	05 (10%)
MA	São Luiz do Maranhão	01 (2%)

FONTE: O autor (2014)

Na Tabela 2 estão listadas as frequências de hábitos pesquisados no estudo.

TABELA 2 - HÁBITOS DOS PACIENTES DO GRUPO AF-NT

HÁBITOS	n	%
Álcool	01	2
Tabagismo	01	2
Uso de Enxaguatórios	04	8
Beijo na boca	17	34
Beijo na boca dos pais	02	4
Beijo na boca do companheiro(a)	16	32
Relação Sexual	04	8
Uso de preservativos	03	6

FONTE: O autor (2014)

Na Tabela 3 estão listados os achados de exame físico dos pacientes estudados.

TABELA 3 - ACHADOS DE EXAME CLÍNICO DOS PACIENTES DO GRUPO AF-NT

ACHADOS DE EXAME FÍSICO	n	%
Cárie	15	30
Gengivite	06	12
Papiloma	00	0
DECH	00	0
CEC	00	0
Leucoplasia	01	2
Líquen Plano	00	0
Verruga	00	0
Hiperplasia Epitelial Focal	00	0
Lesão Aftosa	03	6

FONTE: O autor (2014)

4.1.2 GRUPO AF-T – PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI QUE FORAM SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

Constituíram este grupo 50 pacientes portadores de Anemia de Fanconi, que foram submetidos ao Transplante de Medula Óssea, com mediana de idade de 12,0 anos, variando de 4,0 a 27,5 anos (IC 95% = 7,0 – 17,5), sendo 22 do sexo masculino (44%) e 28 do sexo feminino (56%).

O Gráfico 3 ilustra a distribuição da idade neste grupo de estudo.

Dos três pacientes com idade superior a 18 anos, nenhum era casado.

O Gráfico 4 ilustra a distribuição da escolaridade no grupo estudado. Dos pacientes sem escolaridade apenas um tinha idade superior a 6 anos, com 8 anos de idade.

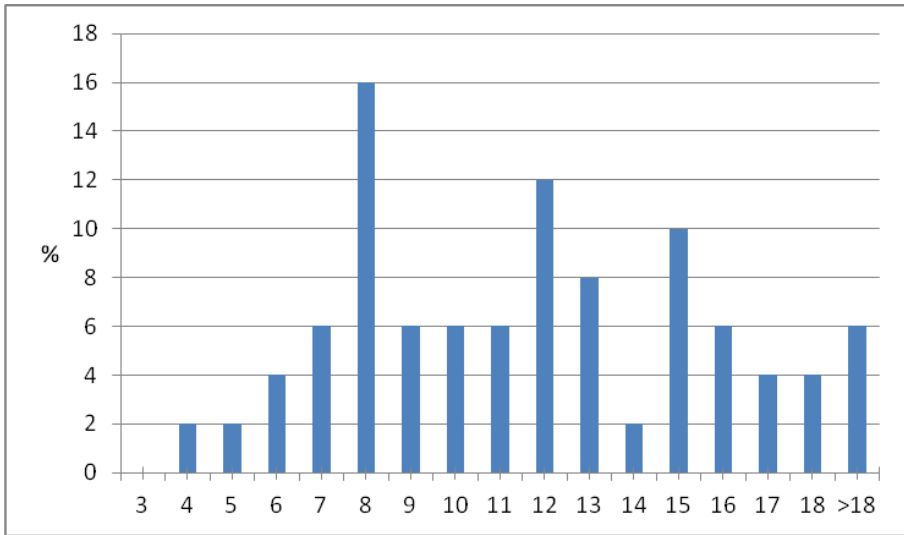


GRÁFICO 3 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DA IDADE DOS PACIENTES DO GRUPO AF-T

FONTE: O autor (2014)

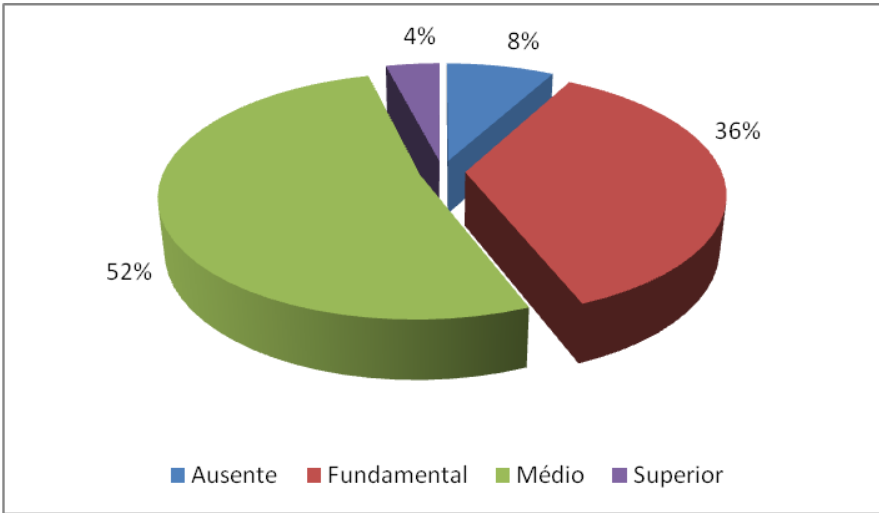


GRÁFICO 4 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DE ESCOLARIDADE DOS PACIENTES DO GRUPO AF-T

FONTE: O autor (2014)

Os pacientes foram provenientes de 18 estados do Brasil. Sete pacientes (14%) foram provenientes do Estado do Paraná. Os estados com maior frequência de pacientes foram: Santa Catarina (20%), Paraná (14%), São Paulo (12%) e Minas Gerais (8%).

A Figura 10 ilustra a distribuição dos casos estudados em relação ao estado de origem.



FIGURA 10 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO ESTADO DE ORIGEM DOS PACIENTES DO GRUPO AF-T

FONTE: O autor (2014)

A Figura 11 ilustra a distribuição dos casos estudados em relação às regiões de origem no país.

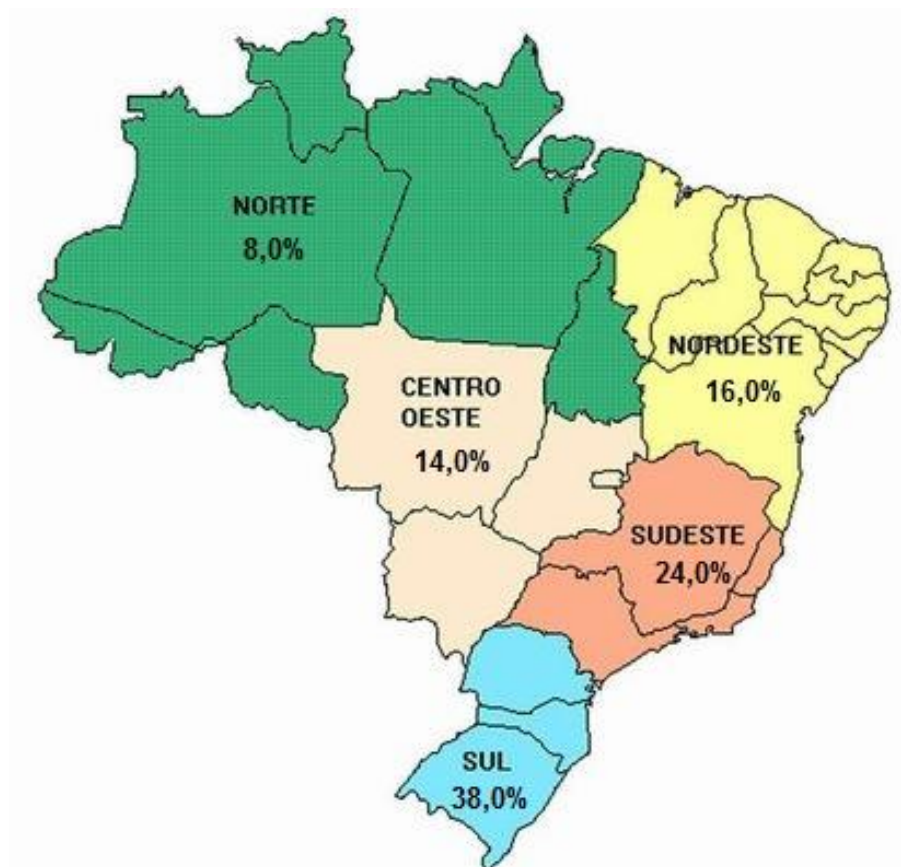


FIGURA 11 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO ESTADO DE ORIGEM DOS PACIENTES DO GRUPO AF-T

FONTE: O autor (2014)

Na Tabela 4 estão listadas as Cidades e respectivos Estados de origem dos pacientes com Anemia de Fanconi submetidos ao Transplante de Medula Óssea.

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS CIDADES E ESTADOS DE ORIGEM DOS PACIENTES DO GRUPO AF-T

ESTADO	CIDADE	n (%)
MG	Contagem, Poços de Caldas, Carambola	04 (8%)
DF	Brasília	02 (4%)
SC	Florianópolis, Criciúma, Jundiaí, Brusque, Blumenau, Navegantes	10,0 (20%)
PI	Terezina	02 (4%)
RO	Boa Vista, Vilena	02 (4%)
BA	Salvador	03 (6%)
RS	Novo Hamburgo, São José do Norte	02 (4%)
GO	Cristalina, Caldas Novas, Catalão	03 (6%)
MS	Cuiabá	01 (2%)
SP	Indaiatuba, Com. Miguel, Itatiba, São Caetano do Sul, Cabrália Paulista, Avaré	06 (12%)
PR	São Mateus do Sul, Mirador, Ponta Grossa, Londrina, G. Moreira	07 (14%)
RJ	Rio de Janeiro	01 (2%)
CE	Fortaleza	01 (2%)
PA	Paranapenas, Areias de Baraúnas	02 (4%)
ES	Guarapari	01 (2%)
MT	Cuiabá	01 (2%)

FONTE: O autor (2014)

Na Tabela 5 estão listadas as frequências de hábitos dos pacientes do grupo AF-T. Na Tabela 6 estão listados os achados de exame físico dos pacientes estudados.

TABELA 5 - HÁBITOS DOS PACIENTES DO GRUPO AF-T

HÁBITOS	n	%
Álcool	01	2
Tabagismo	01	2
Uso de Enxaguatórios	03	6
Beijo na boca	16	32
Beijo na boca dos pais	02	4
Beijo na boca do companheiro(a)	15	30
Relação Sexual	03	6
Uso de preservativos	03	6

FONTE: O autor (2014)

TABELA 6 - ACHADOS DE EXAME CLÍNICO DOS PACIENTES DO GRUPO AF-T

ACHADOS DE EXAME FÍSICO	n	%
Cárie	12	24
Gengivite	04	8
Papiloma	00	0
DECH	03	6
CEC	00	0
Lesão branca	05	10
Líquen Plano	00	0
Verruga	00	0
Hiperplasia Epitelial Focal	00	0
Lesão Aftosa	00	0

FONTE: O autor (2014)

4.2 GRUPO CONTROLE – PACIENTES SEM ANEMIA DE FANCONI E SAUDÁVEIS

Constituiu este grupo 50 pacientes habituais de consultório de Odontologia Clínica, com mediana de idade de 11,0 anos, variando de 4,0 a 30,0 anos (IC 95% = 6,0 – 18,0), sendo 21 do sexo masculino (42%) e 29 do sexo feminino (58%).

O Gráfico 5 ilustra a distribuição da idade neste grupo de estudo.

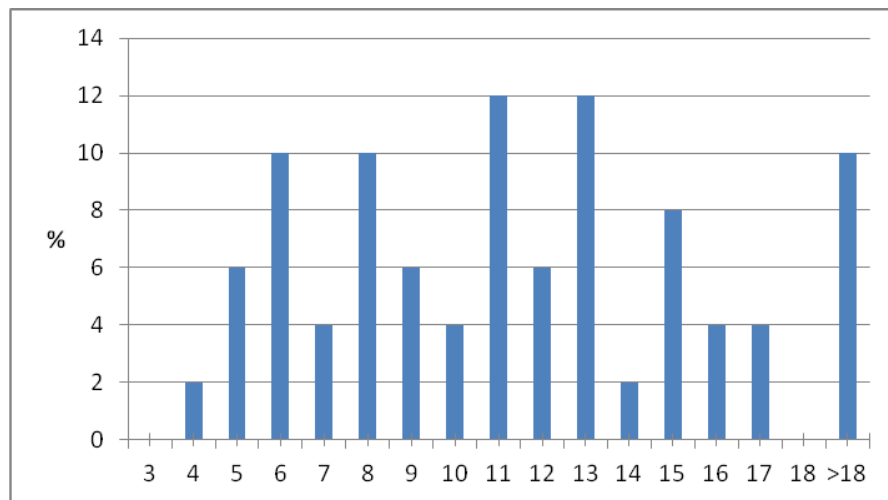


GRÁFICO 5 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DA IDADE DOS PACIENTES DO GRUPO CONTROLE

FONTE: O autor (2014)

Dos cinco pacientes com idade superior a 18 anos, dois eram casados.

O Gráfico 6 ilustra a distribuição da escolaridade no grupo estudado. Dos pacientes sem escolaridade nenhum tinha idade superior a 6 anos.

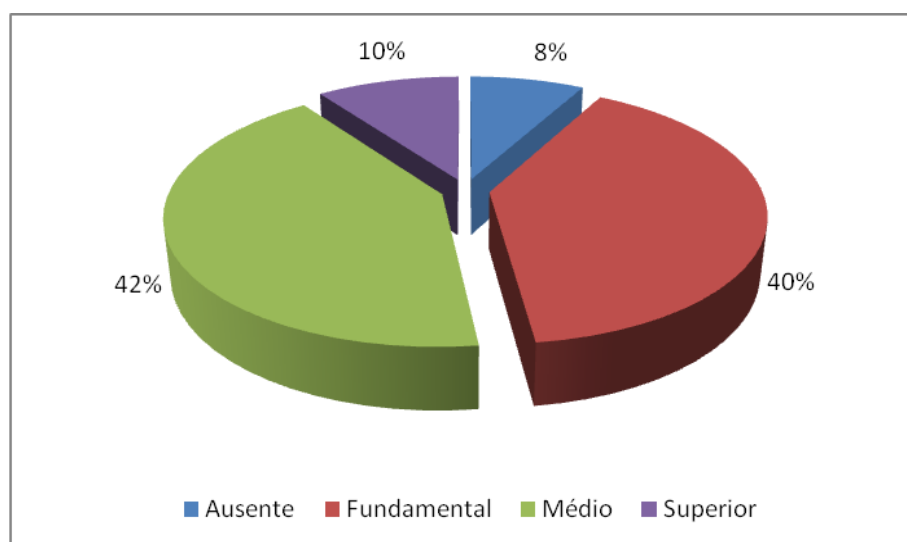


GRÁFICO 6 – DISTRIBUIÇÃO DE ESCOLARIDADE DOS PACIENTES DO GRUPO CONTROLE

FONTE: O autor (2014)

Todos os pacientes pertencentes a este grupo foram provenientes da cidade de Curitiba – Paraná.

Na Tabela 7 estão listadas as frequências de hábitos pesquisados no estudo.

TABELA 7 - HÁBITOS DOS PACIENTES DO GRUPO CONTROLE

HÁBITOS	n	%
Álcool	01	2
Tabagismo	02	4
Uso de Enxaguatórios	03	6
Beijo na boca	14	28
Beijo na boca dos pais	00	0
Beijo na boca do companheiro	14	28
Relação Sexual	06	12
Uso de preservativos	06	12

FONTE: O autor (2014)

Na Tabela 8 estão listados os achados de exame físico dos pacientes estudados.

TABELA 8 - ACHADOS DE EXAME FÍSICO DOS PACIENTES DO GRUPO CONTROLE

ACHADOS DE EXAME FÍSICO	n	%
Cárie	06	12
Gengivite	02	4
Lesão	00	0
Papiloma	00	0
DECH	00	0
CEC	00	0
Lesão branca	00	0
Líquen Plano	00	0
Verruga	00	0
Hiperplasia Epitelial Focal	00	0
Lesão Aftosa	00	0

FONTE: O autor (2014)

4.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS CONTROLE, AF-NT E AF-T

No que se refere à idade os grupos foram semelhantes ($p = 0,41$) (Gráfico 7).

Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao sexo ($p = 0,21$) (Gráfico 8).

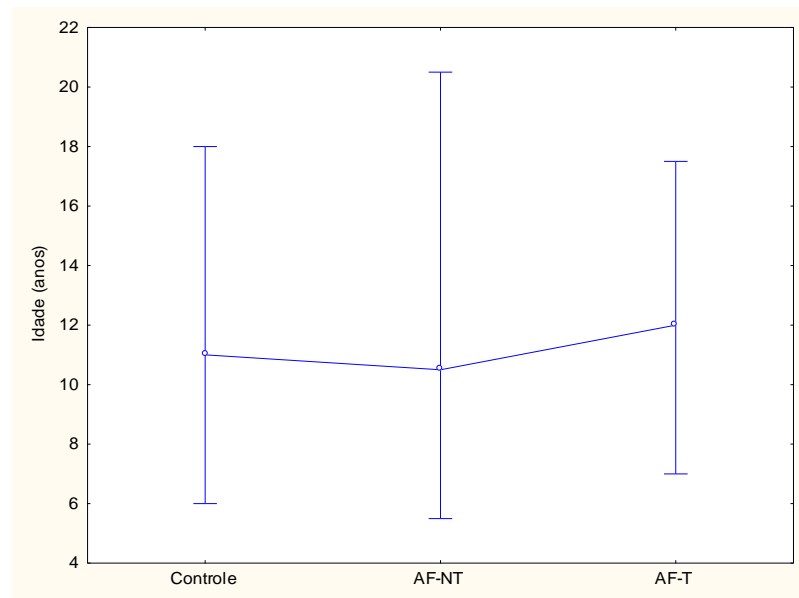


GRÁFICO 7 – DISTRIBUIÇÃO DAS MEDIANAS DE IDADE NOS GRUPOS DE ESTUDO

NOTA: Anova: $p = 0,41$

FONTE: O autor (2014)

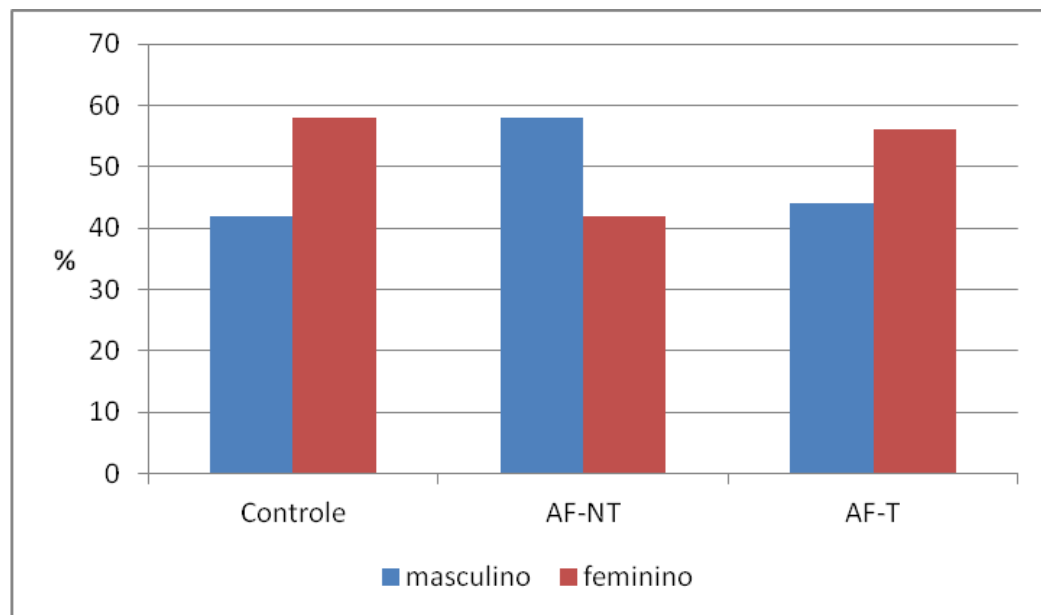


GRÁFICO 8 – DISTRIBUIÇÃO DO SEXO DE ACORDO COM OS GRUPOS DE ESTUDO

NOTA: Teste Qui-quadrado de Pearson: $p = 0,21$

FONTE: O autor (2014)

A frequência de pacientes casados foi baixa e semelhante entre os grupos ($p = 0,35$).

O Gráfico 9 ilustra a distribuição da escolaridade, que também foi semelhante entre os grupos ($p = 0,20$).

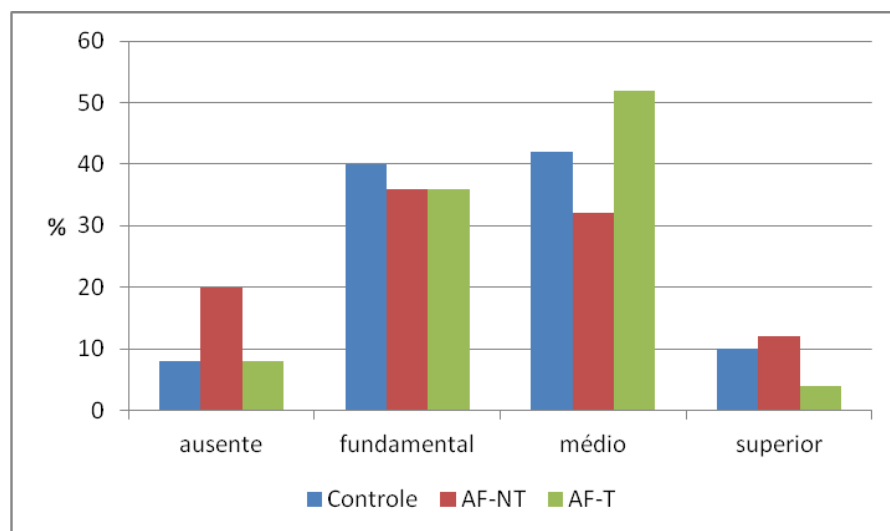


GRÁFICO 9 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DE ESCOLARIDADE DOS PACIENTES NOS GRUPOS DE ESTUDO

NOTA: Teste qui-quadrado de Pearson: $p = 0,20$

FONTE: O autor (2014)

Os pacientes com Anemia de Fanconi foram provenientes de 21 Estados do Brasil. Quinze pacientes (15%) foram provenientes do Estado do Paraná. Os estados com maior frequência de pacientes foram: Santa Catarina (17%), Paraná e São Paulo (15%) e Bahia (10%). Não se observou diferença de distribuição de origem entre os dois grupos de estudo ($p > 0,05$). A Figura 12 ilustra a distribuição da origem de todos os casos de Anemia de Fanconi estudados ($n = 100$).



FIGURA 12 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO ESTADO DE ORIGEM
DOS PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI

FONTE: O autor (2014)

A Figura 13 ilustra a distribuição dos casos de Anemia de Fanconi estudados em relação à região de origem.

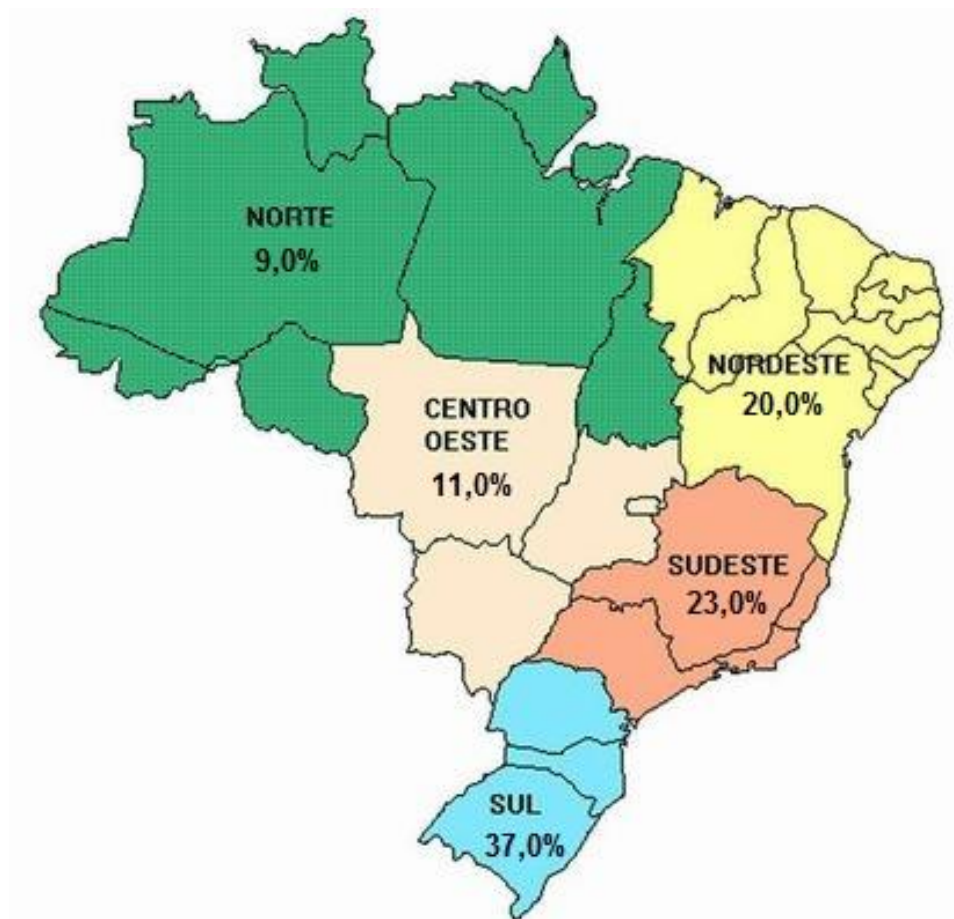


FIGURA 13 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DAS REGIÕES DE ORIGEM DOS PACIENTES COM ANEMIA DE FACONI

FONTE: O autor (2014)

Na Tabela 9 estão listadas as frequências de hábitos pesquisados no estudo.

TABELA 9 - DISTRIBUIÇÃO DOS HÁBITOS NOS GRUPOS DE ESTUDO

HÁBITOS	CONTROLE (n = 50)	AF-NT (n = 50)	AF-T (n = 50)	p
Álcool	01 (2%)	01 (2%)	01 (2%)	1,00
Tabagismo	01 (2%)	02 (4%)	01 (2%)	0,77
Uso de Enxaguatórios	03 (6%)	03 (6%)	04 (8%)	0,89
Beijo na boca	16 (32%)	14 (28%)	17 (34%)	0,80
Beijo na boca dos pais	02 (4%)	00 (0%)	02 (4%)	0,35
Beijo na boca do companheiro	15 (30%)	14 (28%)	16 (32%)	0,90
Relação Sexual	03 (6%)	03 (6%)	04 (8%)	0,89
Uso de preservativos	03 (6%)	06 (12%)	03 (6%)	0,44

NOTA: Teste Qui-quadrado de Pearson

FONTE: O autor (2014)

Na Tabela 10 estão listados os achados de exame físico dos pacientes estudados.

TABELA 10 - DISTRIBUIÇÃO DAS LESÕES OBSERVADAS AO EXAME FÍSICO NOS GRUPOS DE ESTUDO

LESÃO	CONTROLE (n = 50)	AF-NT (n = 50)	AF-T (n = 50)	p
Cárie	06 (12%)	15 (30%)	12 (24%)	0,32
Gengivite	02 (4%)	06 (12%)	04 (8%)	0,33
DECH	---	00 (0%)	03 (6%)	0,04
Lesão branca	00 (0%)	01 (2%)	05 (10%)	0,02
Lesão Aftosa	00 (0%)	03 (6%)	00 (0%)	0,02

NOTA: Teste Qui-quadrado de Pearson

FONTE: O autor (2014)

4.4 EXAME DO HPV DE ALTO RISCO

Em apenas um paciente o exame de HPV foi positivo. Trata-se de um paciente do sexo masculino, com 15 anos, cursando o ensino médio, procedente de Aracaju – SE, portador de Anemia de Fanconi e submetido ao Transplante de Medula Óssea após 96 dias. De hábitos identificou-se apenas o beijo e ao exame físico, uma lesão de tecido mole, sugestiva de lesão branca (Figura 14).



FIGURA 14 – LESÃO BRANCA EM LÍNGUA DE INDIVÍDUO COM AF
FONTE: O autor (2014)

4.5 ANÁLISE PAREADA PARA HPV DE BAIXO E ALTO RISCO

Para esta análise foram selecionados 12 pacientes do Grupo AF-T que apresentavam possibilidade de pareamento com pacientes do grupo AF-NT e Controle. Assim, foram selecionados 12 casos, com seus respectivos pares, de acordo com o sexo e idade.

Constituíram a amostra de estudo, desta forma, 12 pacientes do grupo AF-T, 12 pacientes do grupo AF-NT e 12 pacientes do grupo Controle.

No que se refere à idade os grupos foram semelhantes ($p = 0,73$) (Gráfico 10).

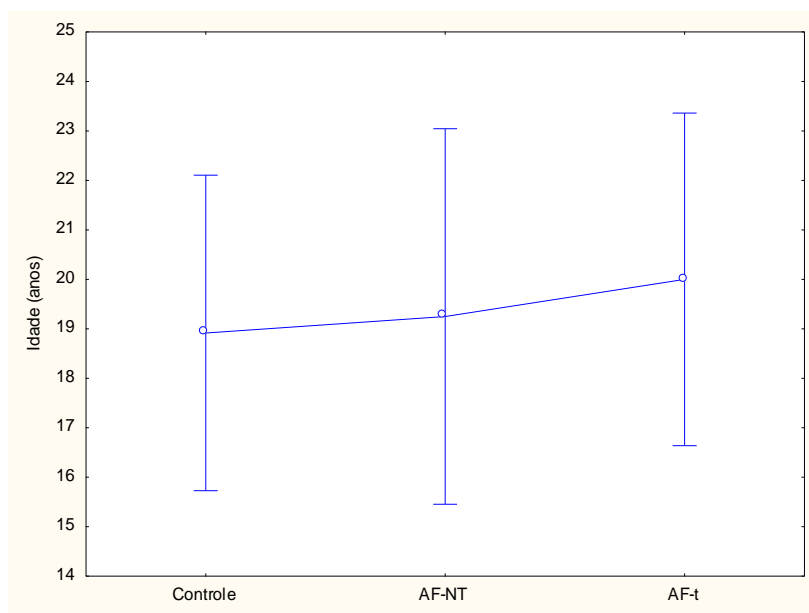


GRÁFICO 10 – DISTRIBUIÇÃO DAS MÉDIAS DE IDADE NOS GRUPOS DE ESTUDO

NOTA: Anova: $p = 0,73$

FONTE: O autor (2014)

Os casos foram pareados em relação ao sexo, portanto, cada grupo com seis meninas e seis meninos, todos solteiros, a maior parte cursando ensino médio (50 ~ 60%).

Na Tabela 11 estão listadas as frequências de hábitos pesquisados no estudo. Na Tabela 12 estão listados os achados de exame físico dos pacientes estudados.

TABELA 11 - DISTRIBUIÇÃO DOS HÁBITOS NOS GRUPOS DE ESTUDO

HÁBITOS	CONTROLE (n = 12)	AF-NT (n = 12)	AF-T (n = 12)	p
Álcool	01 (8,3%)	01 (8,3%)	01 (8,3%)	1,00
Tabagismo	02 (16,7%)	01 (8,3%)	01 (8,3%)	0,51
Uso de Enxaguatórios	00 (0%)	00 (0%)	01 (8,3%)	0,97
Beijo na boca	07 (58,3%)	09 (75%)	08 (66,7%)	0,38
Relação Sexual	03 (25%)	02 (16,7%)	04 (33,3%)	0,34
Uso de preservativos	01 (8,3%)	01 (8,3%)	03 (25%)	0,27

NOTA: Teste Qui-quadrado de Pearson

FONTE: O autor (2014)

TABELA 12 - DISTRIBUIÇÃO DAS LESÕES OBSERVADAS AO EXAME FÍSICO NOS GRUPOS DE ESTUDO

LESÃO	CONTROLE (n = 12)	AF-NT (n = 12)	AF-T (n = 12)	p ¹	p ²
Cárie	00 (0%)	03 (35%)	01 (8,3%)	0,02	0,10
Gengivite	00 (0%)	00 (0%)	00 (0%)	1,00	1,00
DECH	---	00 (0%)	01 (8,3%)	1,00	0,10
Lesão branca	00 (0%)	00 (0%)	01 (8,3%)	1,00	0,10
Lesão Aftosa	00 (0%)	00 (0%)	00 (0%)	1,00	1,00

NOTA: Teste Qui-quadrado de Pearson

FONTE: O autor (2014)

5 DISCUSSÃO

5.1 EPIDEMIOLOGIA NA ANEMIA DE FANCONI

A Anemia de Fanconi é uma doença rara, que apresenta grande heterogeneidade fenotípica e genotípica (ALTER; GREENE; VELAZQUEZ, 2003), caracteriza-se pela instabilidade cromossômica, e apresenta alterações hematológicas progressivas e predisposição ao desenvolvimento de malignidades hematológicas e tumores sólidos (ROSENBERG *et al.*, 2005).

Não se observou predomínio em nenhum dos sexos em pacientes com AF, compatível com dados apresentados na literatura (ARAÚJO, 2007). No presente estudo a maior parte dos pacientes estavam frequentando a escola.

A maioria dos pacientes foram provenientes do sul do país - Santa Catarina e Paraná; sudeste, representado pelo estado de São Paulo e nordeste - Bahia. Não foram encontrados estudos brasileiros na literatura com dados epidemiológicos sobre o estado ou região de origem de pacientes com AF. A literatura relaciona a consanguinidade a etiologia da síndrome - sendo segregada de maneira autossômica recessiva (ZEN *et al.*, 2011).

5.2 PREVALÊNCIA DE HPV EM AF

Atualmente, é bem conhecida a ligação entre o carcinoma anogenital e o cervical uterino com o vírus HPV oncogênico, entretanto, a relação do HPV com o carcinoma bucal ainda não está bem estabelecida na população em geral. A possível relação do HPV na etiologia das lesões neoplásicas e nas neoplasias malignas bucais foi primeiramente estimada em 1983, quando foram descritas alterações citopáticas de HPV (coilocitos) em neoplasias bucais, iguais as encontradas em lesões pré-neoplásicas e carcinomas da cérvix uterina (SYRJÄNEN *et al.*, 1983). Mais recentemente, alguns

autores reafirmaram a hipótese da participação do HPV na carcinogênese (LOWY; GILLISON, 2003; SPARDY *et al.*, 2007). Um dos tumores sólidos que mais acometem os pacientes com AF são os CEC encontrados na região de cabeça e pescoço, que se desenvolvem após o TCTH (PASQUINI *et al.*, 2003), daí a grande importância na realização de exame intrabucal nessa população, ajudando assim no diagnóstico e tratamento. O diagnóstico precoce e o acompanhamento de lesões com potencial de malignização é fundamental para um bom prognóstico, menor mortalidade e morbidade nesses indivíduos (ALTER; GREENE; VELAZQUEZ, 2003; ACHA *et al.*, 2005).

Esta pesquisa foi conduzida com três grupos distintos, a saber: 50 pacientes com AF que não passaram por TCTH, 50 pacientes com AF que passaram por TCTH e 50 indivíduos saudáveis, com o intuito de investigar a prevalência de HPV e verificar se o HPV foi mais prevalente nos indivíduos portadores da doença e, também, se o transplante de medula óssea pode ser mais uma fator de suscetibilidade à citada infecção.

Alguns autores atribuem à terapia imunossupressora prévia ao TCTH realizado nos pacientes com AF, o aumento de incidência de neoplasias (SOCIÉ *et al.*, 1998; KOLB *et al.*, 1999), outros atribuem a imunodeficiência (característica da AF) como principal fator (PASQUINI *et al.*, 2003; KUTLER *et al.*, 2003b). No período pré-TCTH, devido ao regime de condicionamento que promove pancitopenia, há vulnerabilidade para infecções virais, fúngicas e bacterianas (SONIS *et al.*, 1995).

Nos pacientes com AF aqui estudados, a média de idade foi de $11,7 \pm 0,7$ anos, não tendo sido encontrados estudos envolvendo pacientes na mesma faixa etária, ainda escassos na literatura. Porém, autores afirmam a grande influência da idade na infecção pelo vírus HPV, bem como em relação ao aparecimento de lesões neoplásicas. As crianças, como no caso do presente estudo, considerando a média de idade, apresentam menor probabilidade de infectar-se pelo vírus, tendo em vista ainda a pouca exposição ao mesmo. Na literatura observa-se que as maiores prevalências de HPV são encontradas em pacientes com idades até 40 anos, relacionado à prática de sexo oral, anal e oro-genital (CRUZ *et al.*, 1996; SMITH *et al.*, 2004; GIOVANELLI *et al.*, 2002, GILLISSON, 2012).

Em apenas um caso houve positividade para HPV não tipificado, em um paciente com AF, submetido ao TCTH, representando 1% do total de casos de AF e 2% do total de casos de AF submetidos ao TCTH. O referido paciente, do sexo masculino, cursando o ensino médio e com 15 anos de idade, proveniente de Aracajú-SE, passou por TCTH 96 dias antes de realizar a coleta para exame de HPV e o contato físico, descrito pelo paciente, foi de beijo na boca de uma companheira.

As frequências observadas de 1% do total de casos de AF e de 2% do total de casos de AF submetidos ao TCTH não foram estatisticamente diferentes da negatividade observada em todos os indivíduos que constituíram o grupo controle ($p = 0,47$). Assim, a prevalência de HPV não foi maior em portadores de AF e nem tampouco nos pacientes submetidos ao TCTH.

Os resultados encontrados no presente estudo, foram diferentes de pesquisa semelhante, em que foram analisados 40 pacientes com AF, sendo 20 transplantados e 20 não transplantados, onde a prevalência de HPV foi elevada nos pacientes com AF que passaram por TCTH (35%) e também foi alta nos que não passaram por TCTH (27,3%), tendo sido influenciado pela idade e pelo tempo de TCTH (ARAUJO *et al.*, 2007).

5.3 PREVALÊNCIA HPV POPULAÇÃO EM GERAL - GRUPO CONTROLE

Na população em geral, o vírus HPV tem sido pouco encontrado ou não encontrado em mucosa bucal normal, como no presente estudo. Em uma pesquisa com 100 estudantes universitários, de 20 a 31 anos, sem história, queixas ou lesões visíveis ao exame físico de cavidade bucal e orofaringe, após análise por PCR, os resultados mostraram ausência de HPV em todas as amostras (ESQUENAZI *et al.*, 2010), assim como no estudo de Migaldi *et al.*, 2012 em que, de 81 indivíduos italianos, apenas um indivíduo apresentou positividade para HPV bucal (tipificado como HPV 90). Em outro estudo, em 30 mulheres, com idade de 14 a 51 anos, submetidas a exame e coleta por raspagem da cavidade bucal, nenhuma das amostras foi positiva para HPV (CASTRO *et al.*, 2009). Entre 2009 e 2011, 408 meninas e 82 meninos, em uma clínica em Estocolmo,

realizaram bochechos com Listerine 50% - 15 ml, para detecção de HPV bucal. Das 490 amostras, 9,3% (45 /483) apresentaram resultados positivos para HPV (DU *et al.*, 2012). Em uma pesquisa realizada com 4.150 crianças em idade escolar e adolescentes com idades entre 10-18 anos, na região de Wielkopolska, na Polônia, coletou-se células bucais através de bochechos com soluções salinas. Quarenta e cinco indivíduos (1,08% da amostra) eram portadores de HPV da orofaringe (DURZYNSKA *et al.*, 2011).

Os autores atribuem a baixa da defesa imunológica como fator mais importante no aparecimento da infecção por HPV em outros locais do corpo. Na cavidade bucal, além da IgA, há a presença de enzimas proteolíticas que agem como protetoras contra a infecção pelo HPV (CASTRO; MORAES; FURUSE, 2000).

Segundo os dados apresentados, sugere-se que a prevalência do vírus HPV na mucosa bucal da população saudável pode ser muito baixa e, que outros fatores de risco podem ser os responsáveis pelo desenvolvimento de neoplasias bucais.

5.4 MÉTODOS LABORATORIAIS DE DIAGNÓSTICO DE HPV

Migaldi *et al.*, 2012, em revisão de literatura, apresentaram dados inconsistentes em relação a detecção da presença do vírus HPV em mucosa bucal normal, lesões pré-malignas e malignas (variando de 0 % a 100%) nos últimos 30 anos (dentre aproximadamente 883 estudos publicados). Estes resultados foram atribuídos a vários fatores como:

- 1) População estudada – diferentes populações podem ser diferentes em relação a taxas de infecção, estilos de vida, hábitos (uso de álcool, fumo, etc);
- 2) Coleta das amostras - a maneira como a amostra é coletada, isto é, por raspagem, bochecho, biópsia;

- 3) Análises das amostras – utilização de metodologias diferentes para detecção do vírus HPV (imunohistoquímica, a hibridização *in situ*, hibridação *in situ* fluorescente) e os diferentes protocolos e sondas utilizadas no caso de técnicas baseadas em PCR utilizado para a detecção de HPV;
- 4) Tamanhos de amostra diferentes.

Ainda, na opinião dos mesmos autores (Migaldi *et al.*, 2012), o local da amostragem também é de extrema importância, visto que a infecção pelo HPV é mais frequente em mucosa orofaríngea.

O HPV pode ser identificado em amostras de células bucais a partir de procedimentos como imunoperoxidase, hibridizações Southern blot, Northern blot, dot blot e *in situ*, captura híbrida, sequenciamento de DNA, PCR entre outros. Porém, o método de PCR é o que apresenta maior sensibilidade, por detectar o vírus quando menos de uma cópia do DNA viral está presente (TERAI; TAKAGI, 2001).

Neste estudo, objetivou-se um resultado específico e sensível, não sendo realizado um confronto de técnicas.

Empregou-se duas metodologias para detecção e tipificação do HPV: o Abbot realTime High Risk – utilizado com todas as amostras (n =150) e o CLART Pappilomavirus humano 2 – utilizado com apenas 36 amostras pareadas quanto ao sexo e idade nos três grupos, levando-se em conta indivíduos com idades mais avançadas. As duas técnicas moleculares empregam a reação em cadeia polimerase, que são técnicas extremamente sensíveis e permitem um diagnóstico confiável.

Araujo *et al.* (2007) em estudo com pacientes de AF empregou a combinação de duas técnicas moleculares para realização da análise das amostras. Inicialmente utilizou a PCR convencional com o par de primers MY09/MY11 e posteriormente realizou uma *nested* PCR utilizando o par de primers GP5+/GP6+ que gerou uma segunda amplificação de um produto menor, encontrando assim, um número maior de amostras positivas para o vírus HPV.

A *nestedPCR* mostra-se como uma técnica altamente sensível se realizada em condições apropriadas, pois com menores produtos, a amplificação torna-se mais eficiente (HUSNJAK *et al.*, 2000). Porém, o aumento desta detecção deve cautelosamente ser avaliado, pois pode haver uma amplificação não específica (EVANDER *et al.*, 1992). Além disso, a *nestedPCR* é um procedimento pouco prático e mais suscetível a contaminação.(GIOVANELLI *et al.*, 2002).

Em um primeiro ensaio utilizou-se o *Abbott RealTime* HR HPV, um sistema automatizado, qualitativo e em tempo real que detecta 14 tipos de HPV de alto risco, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58,59, 66 e 68. Este teste possui um controle interno para espécimes aderidas de b-globina humana e a cada ensaio controles externos positivos e negativos são incluídos para avaliar a validade da execução (HUANG *et al.*, 2009).

O teste de HPV de alto risco como o da *Abbott RealTime* HR detecta infecções associadas a doenças de alto grau enquanto minimiza resultados positivos devido a infecções transitórias de HPV, por equilibrar sensibilidade clínica e especificidade na detecção da doença (HUANG *et al.*, 2009). Este pode ser um dos motivos pelos quais não foi detectado HPV nos pacientes com AF, desde que não foram pesquisados todos os tipos de HPV.

Na presente pesquisa, também utilizou-se o CLART papillomavirus humano 2, que possui alta sensibilidade e permite a detecção de quantidades mínimas de DNA viral, possui também elevada especificidade, ao utilizar uma sequência correspondente a uma região altamente conservada dentro do genoma viral e em sua hibridização posterior possui sondas de captura específicas para cada tipo de HPV.

Apresenta-se como sendo um método rápido- aproximadamente 8 horas para se obter os resultados e, é fácil de se padronizar em um laboratório hospitalar. Além disso, é capaz de detectar em um único tubo até 35 genótipos de infecções e coinfeções.

Quantidade e qualidade inadequada de DNA das amostras ou a presença de inibidores de DNA polimerase nas amostras apresentam-se como inconvenientes na detecção por amplificação genômica, apresentando resultados falso negativos. Com o

uso deste kit, estes falsos negativos são eliminados devido a introdução dos controles internos no mesmo tubo de reação onde a amostra é analisada (Figura 13).

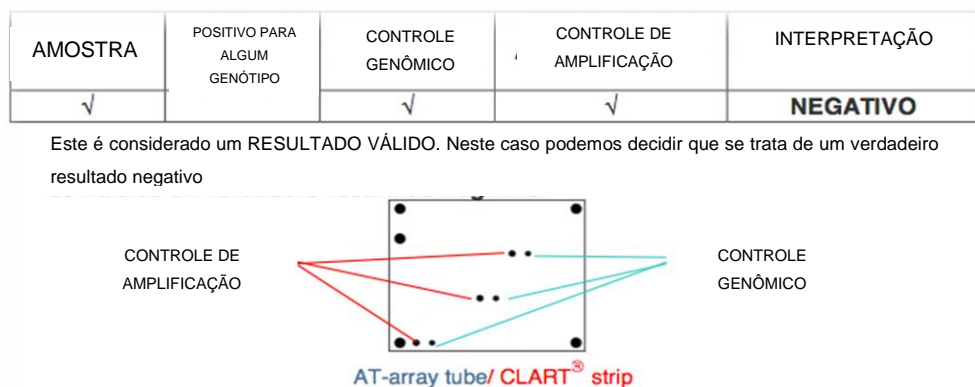


FIGURA 15 - EXEMPLO DE RESULTADO VÁLIDO

5.5 HÁBITOS E COMPORTAMENTOS SOCIAIS NOS PACIENTES COM AF E GRUPO CONTROLE

Em relação ao hábitos e comportamentos sociais observou-se, em geral, baixas frequências. Para o consumo de álcool foi de 2% nos três grupos, em relação ao tabagismo, no grupo AF-NT registrou-se dois pacientes que relataram o hábito (4%) e nos demais grupos, apenas um indivíduo em cada (2%); em relação ao uso de enxaguatórios bucais, no grupo AF-T 4 pacientes informaram o seu uso habitual (8%) enquanto nos demais grupos esta frequência foi de 6%.

Na literatura, é muito difundido o fato de que as neoplasias malignas bucais estão diretamente ligadas ao consumo do tabaco (fumo) e do álcool (NAIR, PILLAI, 2005; SYRJANEN, 2005, HERRERO *et al.*, 2003). Dentre estes, o maior fator de risco para neoplasia de orofaringe é o tabaco, havendo uma clara relação entre aumento do seu risco, numero de cigarros consumidos ao dia e tempo de exposição ao mesmo (SYRJANEN, 2005).

Como segundo fator de risco ao desenvolvimento de neoplasias malignas na região de orofaringe aparece o álcool, relacionando-se fortemente a frequência e número de doses (HERRERO *et al.*, 2003; SYRJÄNEN, 2005). O álcool induz alterações bioquímicas e inflamatórias que atuam sinergicamente na célula de maneira que a lesam (MOLINA *et al.*, 2002), alterando o DNA, resultando em mutações que podem levar à proliferação desordenada das células (BROOKS, 1997). Combinando-se o álcool, o cigarro e um reservatório viral, como é considerada a cavidade bucal, pode-se culminar o desenvolvimento de neoplasias (TERAI *et al.*, 1999).

Há autores que não associam a condição socioeconômica e alguns hábitos como tabagismo, consumo de álcool e atividade sexual com o aparecimento de HPV (DURZYNSKKA *et al.*, 2010)

Pelos resultados deste estudo observa-se que os pacientes e indivíduos praticamente não possuem o hábito de fumar e nem de fazer a ingestão de bebidas alcólicas, possivelmente pela pouca idade dos pacientes aqui estudados.

Muitas pessoas possuem o hábito de utilizar enxaguatórios bucais após a escovação dental. Alguns colutórios bucais encontrados para venda são compostos com álcool em sua composição, utilizado como solvente e conservante do preparo (PELÁEZ *et al.*, 2004). O uso de enxaguatórios com álcool pode expressar efeitos como hiperqueratinização e descamação da mucosa bucal. Este contato pode ser suficiente para expressar efeitos genotóxicos, porém, efeitos diferentes do contato fugaz de quando se ingere bebidas alcoólicas. (ULIANA, BRIQUES, 2003; PELÁEZ *et al.*, 2004)

Não há ainda total comprovação de que os colutórios com álcool possam interferir na carcinogênese, porém, é aconselhável que sejam usados colutórios com parcimônia, em casos específicos, quando indicados pelo cirurgião dentista e preferencialmente sem álcool.

No presente estudo, mesmo havendo um número relativamente alto de indivíduos que tiveram como contato físico o beijo na boca de companheiros (as), (Grupos: AF-NT = 14 (28%); AF-T = 17 (34%) e GC = 16 (32%), não se identificou a presença do vírus HPV. Não foi encontrado relatos na literatura que relacionassem o beijo como fator de transmissão do vírus HPV bucal, impossibilitando assim comparação de

dados. Pode-se questionar, assim, o papel do beijo como fator de risco para a disseminação do vírus ou ainda supor que por se tratar de uma população de baixa idade, a exposição a este tipo de contato físico ainda não teria sido suficiente para a referida predisposição, ou que a imunossupressão não tenha sido importante.

Analisando-se o hábito de relações sexuais, observou-se baixa frequência nos três grupos (AF-NT = 3 (6%); AF-T = 4 (8%); GC = 3 (6%). Fica, de igual modo, e neste aspecto ainda mais claro, que este fator não pode ser levado em conta, dado à pouca idade dos indivíduos estudados e baixa frequência, natural, de vida sexual ativa. Ressalta-se, ainda, a limitação da informação dado ao constrangimento, também natural, dos pacientes e (ou) pais ao se abordar este assunto.

Alguns autores atribuem ao sexo oral um fator de predisposição à infecção, porém, em um estudo onde esta prática sexual foi relatada em 73% dos casos, os resultados para HPV bucal foram negativos. Não se pode afirmar que pacientes com lesão genital e que praticam sexo oral estão de fato mais predispostos a ter HPV na cavidade bucal (CASTRO; MORAES; FURUSE, 2000).

Alguns autores sugerem que melhores condições socioeconômicas, bem como alimentação rica em carotenóides e vitamina C, baixo consumo tabágico e etílico e comportamento heterossexual predominantemente monogâmico, com uso regular de preservativos, favorecem a ausência de infecção por HPV na mucosa bucal normal (ESQUENAZI *et al.*, 2010).

Por outro lado, há autores que correlacionaram a prática de sexo oral à presença viral (73%). Em estudo 125 pacientes foram submetidos à investigação de HPV, por meio de teste de mucosa bucal, realizando-se também questionário sobre questões comportamentais, o HPV foi diagnosticado em 29 pacientes (23,2%), sem que os pacientes apresentassem qualquer manifestação clínicopatológica (TRISTÃO *et al.*, 2012).

5.6 LESÕES BUCAIS SUGESTIVAS DE HPV, CARCINOMA E LESÕES CARIOSAS EM PACIENTES COM AF E GRUPO CONTROLE

No presente estudo, dos pacientes AF-NT encontrou-se com maior frequência lesões cariosas e gengivite (30% e 12%). Lesão branca foi vista em somente 2% dos casos. Dos pacientes submetidos ao TCTH, encontrou-se igualmente maior frequência de lesões cariosas e gengivite (24% e 8%). Neste grupo obsevrrou-se DECH em 6% dos casos e lesão branca em 10%. No grupo controle as alterações mais comumente encontradas também foram as lesões cariosas e gengivite (6% e 4%). No estudo de Araujo *et al.* (2007) foram avaliados 33 pacientes com AF e verificou-se sangramento gengival, biofilme e cálculo em 48% dos pacientes, gengivite ou periodontite em 36%, não relacionado à contagem de plaquetas, sendo o sangramento justificado pela deficiência na higienização dental.

Lyko (2012) Analisou o índice de higiene oral-Simplificado (IHO-S) de pacientes com AF transplantados (n=23), não transplantados (n=25) e indivíduos de um grupo controle, não encontrando diferença significativa entre os grupos, apresentando os três, índice de higiene oral insatisfatório.

Diversas manifestações bucais da AF foram descritas na literatura, embora poucos estudos tenham sido realizados com essa população. Pigmentação melânica em mucosa foi observada em 45% dos pacientes e hematoma em lábio superior e inferior em 30% dos pacientes avaliados por Araujo *et al.* (2007). Sangramento gengival e doença periodontal grave foram encontrados em um paciente com AF de 11 anos de idade, durante o exame odontológico observou-se dor, desconforto, vermelhidão, sangramento e perda de inserção periodontal ao redor dos dentes no estudo de Nowzari *et al.* (2001). Já no estudo de Açikgöz *et al.* (2005) queilite angular, herpes simples e afta ulcerativa recorrente foram descritas.

Em contrapartida, o sangramento gengival foi associado à plaquetopenia e à doença periodontal agressiva em pacientes jovens à resposta do indivíduo (SCHOFIELD, 1980).

Em relação as lesões cariosas, o presente estudo não utilizou o critério técnico da Organização Mundial de Saúde (OMS), apenas contou o número de pacientes que tinha ao menos uma lesão cariada na cavidade bucal, impossibilitando assim uma comparação. Alguns estudos descrevem número elevado de CPO-D (índice de dentes cariados, perdidos e obturados da dentição permanente) e CEO-d (índice de dentes cariados, com indicação de extração e obturados da dentição decídua) na população de AF sem compará-la com um grupo controle (FALCI *et al.*, 2011; TEKCICEK *et al.*, 2007).

Dentre alterações bucais associadas ao HPV, é possível destacar as seguintes: papiloma (HPV 6 e 11), condiloma acuminado (HPV 6 e 11), verruga vulgar (HPV 2 e 4), hiperplasia epitelial focal (HPV 13 e 32), líquen plano, leucoplasia (HPV 6, 11 e 16), carcinoma de células escamosas e carcinoma verrucoso

Neste estudo a lesão mais encontrada foi a leucoplasia bucal, porém sem que tenha sido isolado HPV na cavidade bucal. Esta lesão consiste em uma mancha branca ou placa que não pode ser caracterizada clínica ou histologicamente como qualquer outra doença. Histologicamente, a leucoplasia pode mostrar uma variedade de alterações epiteliais, variando desde hiperplasia epitelial inócua até vários graus de displasia. Foram encontrados HPV 6, 11 e 16 em alguns casos de leucoplasias, entretanto, o papel do HPV na etiologia da leucoplasia bucal não está claro (CASTRO *et al.*, 2004; FELLER; LEMMER, 2012).

Devido a utilização de drogas no período que antecede o TCTH, com objetivo de realizar condicionamento, há uma indução a injúrias às células epiteliais das mucosas bucal e gástrica após o TCTH. Mucosites, infecções, doença periodontal e DECH são frequentemente observadas após TCTH em graus diferentes de comprometimento entre os pacientes (JÚNIOR, 2009). No presente estudo, 3 pacientes, após TCTH, apresentaram DECH em mucosa bucal, confirmando o proposto anteriormente.

Apesar de, neste estudo, nenhum paciente ter apresentado lesão de CEC, é de extrema importância e relevância relacionar-se o mesmo à AF. O tempo de TCTH associado à DECH e a terapia imunossupressora são fatores de alto risco para o desenvolvimento de CEC (CURTIS *et al.*, 2005). Um estudo de coorte de 262 casos relacionou o risco de desenvolvimento de CEC e o risco de morte em pacientes com AF

que receberam e não receberam TCTH. A média no desenvolvimento do CEC foi de 19 anos entre os pacientes que receberam e 33 entre os que não receberam TCTH. Entre os 18 pacientes que desenvolveram CEC, a média de sobrevida após a descoberta foi de 13 meses. Assim, quem não recebeu TCTH teve o risco de morte aumentado em 30 vezes. Fatores de risco para o desenvolvimento do CEC incluem: a) fatores do hospedeiro: DECH, idade do transplante, sexo do paciente; b) fatores do doador: HLA, idade e sexo e c) terapia medicamentosa imunossupressora (ROSENBERG *et al.*, 2005).

No presente estudo, apesar da baixa frequência de HPV encontrada nos pacientes com AF, observou-se um elevado número de pacientes com lesões leucoplásicas. Leucoplasias apresentam grande susceptibilidade para desenvolvimento de CEC. Estes achados chamam a atenção para a necessidade de um rigoroso e frequente acompanhamento dos pacientes com AF multidisciplinarmente para detecção precoce de doenças malignas e doenças bucais.

6 CONCLUSÃO

- a) A prevalência de HPV em pacientes portadores de Anemia de Fanconi na amostra estudada foi de 1%;
- b) Pacientes com AF não apresentaram diferença em relação ao grupo controle em relação a prevalência do vírus HPV bucal;
- c) A prevalência do HPV bucal não foi influenciada pela realização do TCTH;
- d) A prevalência do HPV não foi alterada pelo sexo, idade e hábitos dos indivíduos e pacientes;
- d) Observou-se algumas lesões precursoras de neoplasias malignas bucais, como DECH e lesão branca, e o registro de lesões cariosas e gengivais.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo abordou a investigação da infecção pelo HPV bucal em Anemia de Fanconi, mas em uma população específica: crianças, adolescentes e adultos jovens.

Sabe-se, entretanto, que em muitos carcinomas espinocelulares o HPV é encontrado. Também, sugere-se que a infecção por HPV na orofaringe preceda em 10 anos ou mais o desenvolvimento de neoplasias (MORK *et al.*, 2001). Assim, estudos do tipo coorte, com acompanhamento anual dos participantes, podem contribuir para o esclarecimento da instalação do processo de infecção viral e sua participação carcinogênese.

Vale ressaltar que a vacinação contra HPV resulta em redução significativa da aquisição desta infecção e consequentemente diminuição da doença HPV induzida (Giraldo *et al.*, 2008).

8 REFERÊNCIAS

- Açikgöz A, Ozden FO, Fisgin T, Açikgöz G, Duru F, Yarali N, Albayrak D. Oral and dental findings in Fanconi's anemia. *Pediatr Hematol Oncol*. 2005;22(6):531-9.
- Altay C, Alikaşifoglu M, Kara A, Tunçbilek E, Ozbek N, Schroeder-Kurth TM. Analysis of 65 Turkish patients with congenital aplastic anemia (Fanconi anemia and non-Fanconi anemia): Hacettepe experience. *Clin Genet*. 1997;51(5):296-302.
- Alter BP. Fanconi's anemia and malignancies. Alter BP. *Am J Hematol*. 1996;53(2):99-110.
- Alter BP. Fanconi's anemia, transplantation, and cancer. *Pediatr Transplant*. 2005;9:81-6.
- Alter BP, Greene MH, Velazquez I, Rosenberg OS. Cancer in Fanconi Anemia. *Blood*. 2003;101(5):2072.
- Araujo MR, de Oliveira Ribas M, Koubik AC, Mattioli T, de Lima AA, França BH. Fanconi's anemia: clinical and radiographic oral manifestations. *Oral Dis*. 2007;13(3):291-5.
- Aslan D. Fanconi anemia and squamous cell carcinoma in childhood. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2006;70:1995–1997.
- Auerbach AD. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res*. 2009;31(1-2):4-10.
- Baker KS, Gurney JG, Ness KK, Bhatia R, Forman SJ, Francisco L, McGlave PB, Robison LL, Snyder DS, Weisdorf DJ, Bhatia S. Late effects in survivors of chronic myeloid leukemia treated with hematopoietic cell transplantation: results from the Bone Marrow Transplant Survivor Study. *Blood*. 2004;104(6):1898-906.
- Bettini JDES, Soares EG, Duarte G, Simões RT, Simões AL. PCR Diagnosis of HPV in cervical biopsies of CIN and invasive neoplasia formerly diagnosed as HPV negative. *Acta Cytol*. 2003;47(4):545-9.

Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The casual relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002;55(4):244-265.

Brooks, PL. DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity - a review. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997;21(6):1073-1082.

Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood*. 1994;84(5):1650-5.

Castallsague X, Bosch FX, Munoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res*. 2002;89:191-9.

Castro AL, Moraes, NP, Furuse TA. *Estomatologia*. 3ed. São Paulo: Editora Santos; 2000.

Castro TM, Bussoloti Filho I, Nascimento VX, Xavier SD. HPV detection in the oral and genital mucosa of women with positive histopathological exam for genital HPV, by means of the PCR. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009;75(2):167-71.

Castro TM, Neto CER, Scala KA, Scala W. Manifestações orais associadas ao papilomavírus humano (HPV) conceitos atuais: revisão bibliográfica. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2004;70(4):546-50.

Castro TMPPG, Bussoloti Filho L. Prevalência do papilomavírus humano (HPV) na cavidade oral e na orofaringe. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006;72:272-82.

Cavalcanti SMB, Carestiato FN. Infecções causadas pelos Papilomavírus Humanos: Atualizações sobre aspectos virológicos, epidemiológicos e diagnosticados. *DST. J Bras Doenças Sex. Transm*. 2006;18(1):73-9.

Cruz IB, Snijders PJ, Steenbergen RD, Meijer CJ, Snow GB, Walboomers JM, van der Waal I. Age-dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer Oral Oncol*. 1996;32(1):55-62.

D'Andrea AD, Grompe M. Molecular biology of Fanconi anemia: implications for diagnosis and therapy. *Blood*. 1997;90(5):1725-36.

D'Andrea AD. Susceptibility pathways in Fanconi's anemia and breast cancer. *N Engl J Med.* 2010;362(20):1909-19.

Deeg HJ *et al.* Malignancies after marrow transplantation for aplastic anemia and fanconi anemia: a joint Seattle and Paris analysis of results in 700 patients. *Blood.* 1996;87(1):386-392.

Du J, Nordfors C, Ahrlund-Richter A, Sobkowiak M, Romanitan M, Näsman A, Andersson S, Ramqvist T, Dalianis T. Prevalence of oral human papillomavirus infection among youth. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(9):1468-71.

Durzyńska J, Pacholska-Bogalska J, Kaczmarek M, Hanć T, Durda M, Skrzypczak M, Goździcka-Józefiak A. HPV genotypes in the oral cavity/oropharynx of children and adolescents: cross-sectional survey in Poland. *Eur J Pediatr.* 2011;170(6):757–761.

Esquenazi D, Bussoloti Filho I, Carvalho Mda G, Barros FS. A frequencia do HPV na mucosa oral normal de indivíduos sadios por meio da PCR. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2010;76(1):78-84.

Evander M. *et al.* Comparison of one-step and two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young swedish women. *J Clin Microbiol.* 1992;30(4):987-992.

Faivre L, Guardiola P, Lewis C, Dokal I, Ebell W, Zatterale A, Altay C, Poole J, Stones D, Kwee ML, van Weel-Sipman M, Havenga C, Morgan N, de Winter J, Digweed M, Savoia A, Pronk J, de Ravel T, Jansen S, Joenje H, Gluckman E, Mathew CG. Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in fanconi anemia. European Fanconi Anemia Research Group. *Blood.* 2000;96(13):4064-70.

Falci SGM, Corrêa-Faria P, Tataounoff J, dos Santos CRR, Marques LS. Fanconi's anemia in dentistry: a case report and brief literature review. *Rev Odonto Cienc* 2011;26(3):272-276.

Fanconi's anemia and malignancies: Review. *Am J Hematol.* 1996;53(2):99-110.

Fanconi Anemia Guidelines for diagnosis and management. Fanconi Anemia Research Fund, Inc. Fanconi Anemia: Third Edition, 2008. Disponível em: <<<http://www.asoc-anemiafanconi.es/imagenes/aeaffain.pdf>>>. Acesso em out/2010.

Feller L, Lemmer J. Oral Leukoplakia as It Relates to HPV Infection: A Review. *Int J Dent*. 2012;2012:540561.

Ferraro CTL, Canedo NHS, Oliveira SP, Carvalho MGC, Dias EP. Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. *J Bras Patol Med Lab*. 2011;47(4):451-459.

Ferry C, Socie G. Bone marrow transplantation for leukemia: long term outcome. *Bull Cancer*. 2003;90(7):601-6.

Fredericks BD, Balkin A, Daniel HW, Schonrock J, Ward B, Frazer IH. Transmission of human papillomaviruses from mother to child. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 1993;33(1):30-2.

Giampietro PF, Adler-Brecher B, Verlander PC, Pavlakis SG, Davis JG, Auerbach AD. The need for more accurate and timely diagnosis in Fanconi anemia: a report from the International Fanconi Anemia Registry. *Pediatrics*. 1993;91(6):1116-20.

Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, Graubard BI, Chaturvedi AK. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA*. 2012;307(7): 693-703.

Giovanelli L, Campisi G, Lama A, Giambalvo O, Osborn J, Margiotta V, Ammatuna P. Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *J Infect Dis*. 2002;185(6):833-6.

Giraldo PC, Silva MJPMA, Fedrizzi EM, Gonçalves AKS, Amaral RLG, Junior JE, Figueiredo IV. Prevenção da infecção por HPV e lesões associadas com o uso de vacinas. *J Bras Doenças Sex Transm*. 2008;20(2):132-140.

Gobocan 2012. Disponível em <<http://www.globocan.iarc.fr>> Acesso em out 2014.

Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, Friedl R, Herterich S, Dietrich R, Gruhn B, Schindler D, Hoehn H. Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genome Res.* 2002;98(2-3):126-35.

Guardiola P, Pasquini R, Dokal I, Ortega JJ, van Weel-Sipman M, Marsh JC, Ball SE, Locatelli F, Vermylen C, Skinner R, Ljungman P, Miniero R, Shaw PJ, Souillet G, Michallet M, Bekassy AN, Krivan G, Di Bartolomeo P, Heilmann C, Zanesco L, Cahn JY, Arcese W, Bacigalupo A, Gluckman E. Outcome of 69 allogeneic stem cell transplantations for Fanconi anemia using HLA-matched unrelated donors: a study on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood.* 2000;95(2):422-9.

Guardiola P, Socié G, Li X, Ribaud P, Devergie A, Espérou H, Richard P, Traineau R, Janin A, Gluckman E. Acute graft-versus-host disease in patients with Fanconi anemia or acquired aplastic anemia undergoing bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donors: risk factors and influence on outcome. *Blood.* 2004;103(1):73-77.

Harrison JC *et al.* Surviving the breakup: the DNA damage check- point. *Annu. Rev. Genet.* 2006;40:209–235.

Herrero, U *et al.* Human papillomavirus and oral cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. *J Natl Cancer Inst, Oxford.* 2003;95(23):1772-1783.

Huang S, Tang N, Mak WB, Erickson B, Salituro J, Li Y, Krumpe E, Schneider G, Yu H, Robinson J, Abravaya K. Principles and analytical performance of Abbott RealTime High Risk HPV test. *J Clin Virol.* 2009;45:13-7.

Husnjak K, Grce M, Magdić L, Pavelić K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods.* 2000 Aug;88(2):125-34.

IARC (International Agency for Research on Cancer) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. World Health Organization International Agency for Research on Cancer. 2007;90:1-670.

- Jansisyanont P, Pazoki A, Ord RA. Squamous cell carcinoma of the tongue after bone marrow transplantation in a patient with Fanconi's anemia. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000;58(12):1454-7.
- Koubik AC, Franca BH, Ribas Mde O, de Araujo MR, Mattioli TM, de Lima AA. Comparative study of chronological, bone, and dental age in Fanconi's anemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2006;28(4):260-2.
- Kutler DI, Auerbach AD, Satagopan J, Giampietro PF, Batish SD, Huvos AG, Goberdhan A, Shah JP, Singh B. High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;129(1):106-12.
- Kutler DI, Wreesmann VB, Goberdhan A, Ben-Porat L, Satagopan J, Ngai I, Huvos AG, Giampietro P, Levran O, Pujara K, Diotti R, Carlson D, Hurn LA, Auerbach AD, Singh B. Human papillomavirus DNA and p53 polymorphisms in squamous cell carcinomas from Fanconi anemia patients. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(22):1718-21.
- Lench N, Stanier P, Williamson R. Simple non-invasive method to obtain DNA for gene analysis. *Lancet.* 1988;18(8599):1356-8.
- Liu JM, Buchwald M, Walsh CE, Young NS. Fanconi anemia and novel strategies for therapy. *Blood.* 1994;84(12):3995-4007.
- Lowy DR, Gillison ML. A new link between Fanconi anemia and human papillomavirus-associated malignancies. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Nov 19;95(22):1648-50.
- Lusting JP, Lugassy G, Neder A, Sigler E. Head and neck carcinoma in Fanconi's anaemia--report of a case and review of the literature. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1995;31(1):68-72.
- Lyko, KF. Fatores sociais, comportamentais e microbiológicos associados à saúde bucal de crianças e adolescentes com Anemia de Fanconi. 2012. Dissertação (Mestrado). 195f. Departamento de Odontologia, Universidade Federal do Paraná, 2012.

Masserot C, Peffault de Latour R, Rocha V, Leblanc T, Rigolet A, Pascal F, Janin A, Soulier J, Gluckman E, Socié G. Head and neck squamous cell carcinoma in 13 patients with Fanconi anemia after hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer*. 2008;113(12):3315-22.

Mattioli TM, Koubik AC, de Oliveira Ribas M, França BH, Brancher JA, de Lima AA. Salivary flow rate, calcium, urea, total protein, and amylase levels in fanconi anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2010; 32(2):e46-9.

Medeiros LA, Pasquini R. Anemia aplásica adquirida e anemia de Fanconi - Diretrizes Brasileiras em Transplante de Células-Tronco Hematopoética. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2010;32:40-45.

Migaldi M, Pecorari M, Forbicini G, Nanni N, Grottola A, Grandi T, Delle Donne G, Leocata P, Trovato D, Sgambato A. Low prevalence of human papillomavirus infection in the healthy oral mucosa of a Northern Italian population. *J Oral Pathol Med*. 2012;41(1):16-20.

Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;91(6):622-35.

Molina, PE *et al*. Molecular pathology and clinical aspects of alcohol-induced tissue injury. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002;21(6):120-128.

Mork J, Lie AK, Glatte E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Møller B, Pukkala E, Schiller JT, Youngman L, Lehtinen M, Dillner J. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2001 Apr 12;344(15):1125-31.

Nair, S; Pillai, MR. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral Dis*. 2005;11(6):350-359.

- Nowzari H, Jorgensen MG, Ta TT, Contreras A, Slots J. Aggressive periodontitis associated with Fanconi's anemia. A case report. *J Periodontol*. 2001 Nov;72(11):1601-6.
- Oliveira MC, Soares RC, Pinto LP, Costa ALL. HPV e carcinogênese oral: Revisão bibliográfica. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003;69: 553-9.
- Opinya GN, Kaimenyi JT, Meme JS. Oral findings in Fanconi's anemia. A case report. *J Periodontol*. 1988;59(7):461-3.
- Otan F, Açikgöz G, Sakallioğlu U, Ozkan B. Recurrent aphthous ulcers in Fanconi's anaemia: a case report. *Int J Paediatr Dent*. 2004;14(3):214-7.
- Pasquini R, Neto JZ, Medeiros CR, Bitencourt MA, Bonfim CMS, Moreira VA, Setúbal DC, Flowers MED, Kupka E, Araújo MV. Carcinoma de células escamosas em língua pós-transplante de medula óssea por Anemia de Fanconi *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2003;25(4):239-246.
- Pasquini R. Transplante de medula óssea em anemia aplástica. *Medicina, Ribeirão Preto*. 2000;33:219-231.
- Pasquini, R.; Zanis-Neto, J. Anemia de Fanconi. In: Zago, MA.; Falcão, RP.; Pasquini, R. *Hematologia fundamentos e prática*. São Paulo: Atheneu, 2004. p.169-179.
- Peixoto AP. Detecção do Papilomavírus Humano na Cavidade Bucal de pacientes com infecção por este vírus na mucosa cérvico-vaginal. 2006. 170f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Bahia, Bahia. 2006.
- Peláez MAC, Gómez GCE, Ruiz EF, Lapiedra RC. Colutorios con alcohol y su relación con el cáncer oral. Análisis crítico de la literatura. *Med Oral*. 2004;9:116- 23.
- Reinhard H, Peters I, Gottschling S, Ebell W, Graf N. Squamous cell carcinoma of the tongue in a 13-year-old girl with Fanconi anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2007;29(7):488-91.

Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood*. 2003;101(3):822-6.

Rosenberg PS, Huang Y, Alter BP. Individualized risks of first adverse events in patients with Fanconi anemia. *Blood*. 2004;104(2):350-5.

Rosenberg PS, Socié G, Alter BP, Gluckman E. Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. *Blood*. 2005;105(1):67-73.

Rosenberg PS, Tamary H, Alter BP. How high are carrier frequencies of rare recessive syndromes? Contemporary estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel. *Am J Med Genet*. 2011;155A(8):1877-83.

Sagaseta de IM, Molina, Lezáun I, Valiente A, Durán G Anemia de Fanconi. Consideraciones actuales. *Anales Sis San Navarra*. 2003;26(1):63-78.

Salum FG. *et al*. Squamous cell carcinoma of the tongue after bone marrow transplantation in a patient with Fanconi anemia. *Braz Dent J*. 2006;17(2):161-165.

Salvia PND. Indicadores de doença residual no seguimento de pacientes conizadas por lesão intraepitelial escamosa de alto grau. 2004. 38f. Dissertação (Mestrado). Departamento de Anatomia Patológica, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 2004.

Shimamura A.; Montes De Oca R.; Svenson JL.; Haining N.; Moreau LA.; Nathan DG.; D'andrea, A. D. A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. *Blood*. 2002;100(13):4649-4654.

Shimamura, A. Inherited bone marrow failure syndromes: molecular features. *Hematology. Am Soc Hematol Educ Program*. 2006;34:63-71.

Silva, AAG. Manifestações estomatológicas em pacientes receptores de transplante renal sob terapia imunossupressora. Tese (Doutorado). 1997. 187f. Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 1997.

Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer*. 2004;20;108(5):766-72.

Soares RC, Oliveira MC, Souza LB, Costa AL, Medeiros SR, Pinto LP. Human papillomavirus in oral squamous cells carcinoma in a population of 75 Brazilian patients. *Am J Otolaryngol*. 2007 Nov-Dec;28(6):397-400

Socié G *et al*. Increased incidence of solid malignant tumors after bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. *Blood*. 1991;78(2):277-279.

Socié G *et al*. Transplantation for Fanconi's anaemia: long-term follow-up of fifty patients transplanted from a sibling donor after low-dose cyclophosphamide and thoraco-abdominal irradiation for conditioning. *Br J Haematol*. 1998;103(1):249-255.

Sonis et al. The Oral Health of Long-term Survivors of Acute Lymphoblastic Leukaemia: a Comparison of Three Treatment Modalities. *Oral Oncol*. V. 31, n. 4, p. 250-252, 1995.

Spardy N, Duensing A, Charles D, Haines N, Nakahara T, Lambert PF, Duensing S. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein activates the Fanconi anemia (FA) pathway and causes accelerated chromosomal instability in FA cells. *J Virol*. 2007;81(23):135-70.

Syrjänen, S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virology*. 2005;32(1):59-66.

Taniguchi T, D'Andrea AD (2006) The Molecular Pathogenesis of Fanconi Anemia: Recent Progress (review). *Blood*, 107 (11), 4223-33.

Tekcicek M, Tavit B, Cakar A, Pinar A, Unal S, Gumruk F. Oral and dental findings in children with Fanconi anemia. *Pediatr Dent*. 2007;29(3):248-52.

Teraï M, Hashimoto K, Yoda K, Sata T. High prevalence of human papillomaviruses in the normal oral cavity of adults. *Oral Microbiol Immunol*. 1999;14(4):201-5.

Teraï M, Takagi M. Human papillomavirus in the oral cavity. *Oral Med Pathol* 2001; 6:1-12.

Tristão W, Ribeiro RM, Oliveira CA, Betiol JC, Bettini Jde S. Estudo epidemiológico do HPV na mucosa oral por meio de PCR. Braz J Otorhinolaryngol. 2012;78(4):66-70.

Veiga, LBA. Anemia de Fanconi. Análise Citogenética. 2009. Tese (Doutorado). 207f. Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, 2009.

Uliana RMB, Briques W. Halitose: conceitos básicos sobre, diagnóstico, microbiologia, causas, tratamento. Anais do 15º Conclave Odontológico Internacional de Campinas - n.104 - mar/abr - 2003.

Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. J Oral Pathol Med. 2007;36(10):575-80.

Zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. Bioch Biophys Acta. 1996; 9;1288(2):F55-78.

APÊNDICES

ANEXOS

**ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES
HUMANOS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR**

 **HOSPITAL DE CLÍNICAS**
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



Curitiba, 05 de maio de 2010.

Ilmo (a) Sr. (a)
Larissa Bortolli Guimarães
Neste

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que o **Anexo II Prontuário Odontológico**, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado **"ESTUDO SOBRE A PREVALÊNCIA DO PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) EM PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI"**, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos na data de 05 de maio de 2010. O referido documento atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/93, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0256.0.208.000-09
Registro CEP: 2063.230/2009-10

Atenciosamente,


Renato Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Anexo I

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROTOCOLO Nº: 0256.0.208.000-09 CAAE

PESQUISADOR: Dra. LARISSA BERTOLLI GUIMARÃES – CRO 15156

ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM PACIENTES COM

ANEMIA DE FANCONI

As informações que serão aqui escritas servirão para ajudar você e sua família a entender como será feito este trabalho, e como ele pode ajudar pacientes com Anemia de Fanconi.

- Meu filho (a) é obrigado a participar deste estudo?

Não, só se você quiser. A participação é espontânea.

- Por que deste estudo?

Quando uma pessoa tem Anemia de Fanconi, existe um risco maior de adquirir algumas doenças, entre elas, um vírus que se chama HPV. Este vírus, pode ser achado por esse exame que iremos fazer em seu filho (a). Quanto mais cedo acharmos esse vírus, antes poderemos orientar os pacientes e prevenir lesões.

- Como é feito esse exame?

Primeiro algumas perguntas serão feitas, como idade, uso de medicamentos, história médica, entre outras coisas. Depois disso, a boca do seu filho, será examinada por uma dentista e, seu filho irá fazer um bochecho com água e uma solução e irá colocar a saliva em um pote (cuspir), e essa saliva irá para análise em um laboratório que irá observar a presença ou não do vírus. Assim que possível você será informado do resultado.

- Esse exame dói?

Não, é um exame que não dói, e não fará mal algum ao seu filho (a).

- É preciso pagar por este exame?

Não é preciso pagar por esse exame.

- Se houver qualquer dúvida, nos procure, pergunte, explicaremos tudo que quiser saber sobre o estudo. Larissa Bertolli Guimarães, dentista, especialista em estomatologia, CRO 15156 PR.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Eu _____, responsável legal de _____, li atentamente e entendi todas as informações contidas neste esclarecimento sobre a participação do meu filho (a) neste estudo. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento informado.

Concordo com a participação de meu filho neste estudo sem que nenhum prejuízo seja causado a ele ou aos familiares. Tenho total conhecimento também que nada nos será cobrado. Neste consentimento dou pleno direito para uso a favor do ensino e da divulgação em periódicos científicos sem a divulgação da identidade do meu filho (a), respeitando o código de ética.

Curitiba, ____ de _____ de _____.

Assinatura do Responsável Legal

Assinatura do Pesquisador

PRODUÇÃO ACADÊMICA

POSTER APRESENTADO NO 26TH ANUAL FANCONI ANEMIA RESEARCH
FUND SCIENTIFIC SYMPOSIUM



Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) in Oral Clinical Evaluation in FA patients

De Albuquerque LGB, Magdalena NIR, de Araujo MR, Torres-Pereira CC, Raboni SM, Cat MNL, Nogueira M, Ribeiro LL, Bonfim, CMS¹.

BMT Unit of Federal University of Paraná – Brazil



larissagalbuquerque@icloud.com

Background

Fanconi anemia (FA), or also known as hereditary pancytopenia, is an autosomal recessive disease, which presents chromosomal fragility, characterized by hematological disorders associated with congenital malformations. The disease may progress to severe aplastic anemia due to bone marrow failure. Patients with FA have an increased susceptibility to head and neck cancer - squamous cell carcinoma (SCC) - anogenital tract and oral cavity. Whereas effective treatment for FA is hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), it is known that the risk of developing cancer increases progressively thereafter. Recently, the human papillomavirus (HPV) has been considered as a co-carcinogen agent and intends to involvement in the carcinogenesis of AF.

Objectives

The aim of this study was to investigate the prevalence of oral HPV in Fanconi Anemia patients submitted and not submitted to Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT)

Methods

In the present study were performed anamnesis, physical examination of the mouth and collecting samples of oral epithelial cells by gargling with saline for HPV detection by the polymerase chain reaction technique (PCR) in real time. The study sample (n = 150) were divided into three groups: non-transplanted patients with AF (n = 50), transplanted (n = 50) and healthy individuals (controls) (n = 50).



FIGURE 1 – TONGUE LEUKOPHIC AREA OF FA PATIENT



FIGURE 2 – LEUKOPHIC BUCAL LESION

Results

There were similar between the groups in age, sex and education. Patients with AF were from 21 Brazilian states, with the highest frequency as follows: SC (17%), PR and SP (15%) and BA (10%). There was no difference in the frequency of caries and gingivitis among study groups ($p > 0.05$). The graft versus host disease (GVHD) was found only in patients with AF transplants (6.0, $p = 0.04$). Leukoplakic lesions ($p = 0.02$) were found on most transplant patients (10%) than non-transplanted patients (2%) and aphthous lesions appeared only in non-transplant patients (6%) ($p = 0.02$). It was found only one case of high-risk HPV genotype unspecified. In paired analysis for HPV high and low risk, we selected 12 patients in each group and all results were negative for HPV.

TABLE 1 – HABITS OF NON TRANSPLANT, TRANSPLANTED AND CONTROLS

HABITS	n	%
Alcohol	01	2.0
Smoking	01	2.0
Use of drugs	04	9.0
Kiss on the mouth	17	34.0
Kiss on the lips of parents	02	4.0
Kiss on the mouth of the (extended)	15	30.0
Sexual intercourse	04	8.0
Condom use	03	6.0

TABLE 2 – PREVALENCE OF ORAL LESIONS IN TRANSPLANTED AND NON-TRANSPLANTED PATIENTS

ORAL LESIONS	n	%
Caries	05	10.0
Gingivitis	05	10.0
Periodontitis	05	10.0
Leukoplakia	05	10.0
APHS	05	10.0
GVHD	05	10.0
Leukoplakia	05	10.0
APHS	05	10.0
GVHD	05	10.0
Leukoplakia	05	10.0
APHS	05	10.0
GVHD	05	10.0

TABLE 3 – SOURCE OF ORAL LESIONS IN TRANSPLANTED AND NON-TRANSPLANTED PATIENTS

ORAL LESIONS	n	%
Leukoplakia	05	10.0
APHS	05	10.0
GVHD	05	10.0
Leukoplakia	05	10.0
APHS	05	10.0
GVHD	05	10.0
Leukoplakia	05	10.0
APHS	05	10.0
GVHD	05	10.0
Leukoplakia	05	10.0
APHS	05	10.0
GVHD	05	10.0

Conclusion

There was a higher frequency of oral lesions in patients with AF but no difference was observed between patients with AF transplanted and non-transplanted controls regarding the frequency of HPV.

ARTIGO CIENTÍFICO PARA SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

1. Título: Prevalência do Papilomavírus Humano (HPV) e Avaliação Clínica Bucal em Pacientes com Anemia de Fanconi

2. Título abreviado: HPV e Avaliação Bucal em Anemia de Fanconi

3. Nome dos autores: Larissa B. G. Cavalcanti, Neiva I. R. Magdalena, Melissa R. de Araujo, Cassius C. Torres-Pereira, Mônica N. L. Cat, Sônia M. Raboni, Meri Nogueira, Carmem M. S. Bonfim.

4. Endereço eletrônico dos autores: larissagalbuquerque@icloud.com; neiva@hc.ufpr.br; melissararaujo@hotmail.com; cassiusus.torres@gmail.com; monica.lima.ufpr@gmail.com; sraboni@ufpr.br; carmembonfim@gmail.com

5. Plataforma Lattes CNPq: Todos os autores tem currículo cadastrado na Plataforma Lattes

6. Contribuição específica de cada autor:

Larissa B. G. Cavalcanti – Pesquisadora e Autora. Cirurgiã Dentista, Especialista em Estomatologia, Aluna do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente – Universidade Federal do Paraná;

Neiva I. R. Magdalena – Pesquisadora e Orientadora Principal - Professora Adjunta do Departamento de Pediatria, Curso de Medicina, Universidade Federal do Paraná. Professora do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente em Saúde da Criança e do Adolescente – Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Genética Pediátrica;

Melissa R. de Araujo – Pesquisadora e Co-orientadora na área de Odontologia- Professora Titular da Universidade Positivo, Cirurgiã-Dentista, Pesquisadora e Co-orientadora na área de Odontologia;

Cassius C. Torres-Pereira – Pesquisador e Co-orientador na área de Odontologia Professor Adjunto do Curso de Odontologia – Universidade Federal do Paraná. Professor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Universidade Federal do Paraná;

Mônica N. L. Cat – Responsável pela Análise Estatística - Professora Adjunta do Departamento de Pediatria, Curso de Medicina, Universidade Federal do Paraná. Professora e Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente em Saúde da Criança e do Adolescente – Universidade Federal do Paraná;

Sônia M. Raboni – Responsável pelos Exames Laboratoriais (Virologia) - Chefe do Serviço de Infectologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná,;

Carmem M. S. Bonfim – Pesquisadora e Co-orientadora na área de Transplante de Medula Óssea em Anemia de Fanconi - Médica responsável pelo Serviço de Transplante de Medula Óssea Pediátrico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná,

Meri Nogueira – Pesquisadora e colaboradora na realização de extração do DNA - Professora Adjunta do Departamento de Patologia Médica, Doutora em Biologia Celular e Molecular – UFPR.

7. Conflito de interesses: Nada a Declarar.

8. Universidade Federal do Paraná.

9. Larissa B. G. Cavalcanti, Av. Visconde de Guarapuava, 4415, apartamento 1501, Batel, Curitiba, CEP – 80240-010, larissagalbuquerque@icloud.com, telefone: +55 04130242275, telefone celular: +55 04195087002.

10. Larissa B. G. Cavalcanti, Av. Visconde de Guarapuava, 4415, apartamento 1501, Batel, Curitiba, CEP – 80240-010, larissagalbuquerque@icloud.com, telefone: +55 04130242275, telefone celular: +55 04195087002.

11. Fonte financiadora: Esta pesquisa recebeu fomento do CNPq com concessão de bolsa à autora e do *Cincinnati Children's Hospital* com o fornecimento de equipamento de coleta de amostras para todos os 150 pacientes. Contou ainda com o apoio e participação do Laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas – UFPR, com o equipamento para realização de todas as análises laboratoriais e apoio da APACN e do Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas – UFPR para atendimento dos pacientes com Anemia de Fanconi.

12. Contagem total de palavras: 2.994

13. Contagem total das palavras do resumo: 348; número de Tabelas: 4

Resumo

Objetivo: Avaliar a frequência de HPV em pacientes com Anemia de Fanconi (AF) transplantados e não transplantados. **Métodos:** Estudo da prevalência de HPV em pacientes com Anemia de Fanconi atendidos no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal (HC-UFPR). Foram avaliados, de forma prospectiva, 50 pacientes com AF não transplantados, 50 transplantados e 50 indivíduos saudáveis. Foi realizado exame clínico bucal e coleta de amostras de células epiteliais bucais para detecção do HPV por PCR (*Polimerase Chain Reaction*). **Resultados:** Não se observou diferença na frequência de lesões cariosas e gengivite entre os grupos. A doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) foi encontrada apenas em pacientes com AF transplantados (6%, $p = 0,04$). Lesões leucoplásicas foram mais encontradas em pacientes transplantados (10% *versus* 2%, $p = 0,02$) e lesões aftosas apenas em pacientes não-transplantados (6%) ($p = 0,02$). Observou-se apenas um caso de HPV de alto risco com genótipo não especificado. Em análise pareada para HPV de alto e baixo risco, selecionou-se 12 pacientes de cada grupo e todos os resultados foram negativos para HPV. **Conclusão:** Verificou-se maior frequência de lesões bucais nos pacientes com AF, mas não se observou diferença entre pacientes com AF transplantados, não transplantados e controles em relação à frequência de HPV.

Palavras-Chave: Anemia de Fanconi; Papilomavírus Humano; Reação em Cadeia da Polimerase; Teste de DNA para Papilomavírus Humano; Boca.

Abstract

Fanconi anemia (FA) is usually inherited as an autosomal recessive disorder characterized by progressive pancytopenia, congenital abnormalities and a predisposition to the development of hematological malignancies as well as squamous cell carcinoma of head and neck and anogenital region. Whereas effective treatment for the hematological complications of FA is hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), it is also known that the risk of developing cancer increases progressively thereafter. Recently, the human papillomavirus (HPV) has been considered as a co-carcinogen agent and could be involved in the carcinogenesis of FA. In the present study we performed anamnesis and physical examination of the mouth and we also collected samples of oral epithelial cells by gargling with saline for HPV detection by the polymerase chain reaction technique (PCR) in real time. The study sample (n = 150) were divided into three groups: non-transplanted patients with FA (n = 50) and transplanted patients with FA (n = 50) and healthy individuals (controls) (n = 50). There was no difference between the groups regarding age, sex and levels of education. Patients with FA were from 21 Brazilian states, with the highest frequency as follows: States of Santa Catarina (17%), Parana and Sao Paulo (15%) and Bahia (10%). There was no difference in the frequency of caries and gingivitis among study groups ($p > 0.05$). The identification of Graft versus host disease (GVHD) was found only in transplanted FA patients. Leukoplakic lesions ($p = 0.02$) were found more frequently in transplanted patients (10%) than non-transplanted patients (2%) and aphthous lesions appeared only in non-transplant patients (6%) ($p = 0.02$). It was found only one case of high-risk HPV genotype unspecified. In paired analysis for HPV high and low risk, we selected 12 patients in each group and all results were negative for HPV. In conclusion, A higher frequency of oral lesions were identified in patients with FA but no difference was observed between transplanted , non transplanted patients and healthy controls regarding the presence of HPV.

Keywords: Fanconi Anemia; Papillomavirus infections; Polymerase Chain Reaction; Human Papillomavirus DNA Tests; Mouth.

Introdução

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença genética rara, descrita pelo pediatra suíço Guido Fanconi, em 1927. É uma doença de fragilidade cromossômica, autossômica recessiva ou ligada ao X, tendo características hematológicas e manifestações clínicas específicas. Apresenta como características clínicas malformações esqueléticas, hipogonadismo, retardo de crescimento, microcefalia e manchas de hiperpigmentação na pele e, ocorre na primeira década de vida. A ampla variedade da expressão clínica da AF se deve provavelmente aos vários produtos gênicos envolvidos na mesma via de reparo, porém, em diferentes pontos ou até mesmo atuando em diferentes vias¹.

Hematologicamente caracteriza-se por pancitopenia e pela predisposição ao desenvolvimento de neoplasias malignas, como a leucemia e os tumores sólidos. Há uma predisposição marcante ao desenvolvimento de neoplasias, principalmente à leucemia mielóide aguda (LMA), à síndrome mielodisplásica (SMD) e tumores sólidos. As neoplasias aparecem principalmente após os 20 anos de idade. Mulheres desenvolvem frequentemente câncer de mama, de colo de útero e vulva. A partir dos 40 anos a incidência aumenta para ambos os sexos, principalmente se fumantes, de neoplasias de cabeça, pescoço e esôfago².

Na AF, a falência de medula óssea é tratada pelo transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). Há melhora no quadro hematológico, porém estes pacientes apresentam aumento da predisposição ao desenvolvimento de tumores sólidos, principalmente o carcinoma espinocelular (CEC) no fígado, na região de cabeça e pescoço e trato genital. Atualmente, neoplasias malignas da cavidade bucal são associadas ao HPV, principalmente o CEC. Após o TCTH, o desenvolvimento de tumores sólidos aumenta, devido à associação existente entre o condicionamento pré-TCTH, a imunossupressão pós-TCTH, a instabilidade cromossômica e a insuficiência da medula óssea inerente à AF. O TCTH diminui o risco de neoplasias linfóides, porém aumenta progressivamente o risco de desenvolvimento de tumores sólidos³.

Indivíduos com AF não submetidos ao TCTH apresentam um risco 30 vezes maior de desenvolver carcinoma espinocelular (CEC); em contrapartida, aqueles que passaram por TCTH apresentam um risco 66 vezes maior em desenvolvê-lo⁴.

Manifestações Bucais

Na AF observam-se anomalias dentárias de número (presença de agenesias e dentes supranumerários), posição (presença de giroversões, transposições dentária e diastemas), dimensão e forma (raízes curvas, afiladas e com dilacerações apicais; taurodontia, microdontia e hipoplasia de esmalte. Devido ao déficit de hormônios de crescimento e, conseqüentemente, baixa estatura, observa-se discrepância entre a idade dentária, cronológica e óssea, cujas idades dental e óssea são inferiores a idade cronológica⁵.

A condição sistêmica, somada a baixa higiene bucal, são agentes agravantes ao desenvolvimento de sangramentos gengivais, hiperemias, gengivite e periodontite nos indivíduos com AF. A trombocitopenia exacerba o sangramento gengival e a anemia crônica pode favorecer a palidez da mucosa e da gengiva. A condição hematológica dos indivíduos com AF não interfere na presença ou ausência da doença periodontal, mas sim a condição de higiene⁶.

Comuns nos jovens e adolescentes com AF, a prevalência de cárie na AF é de 35%, mas as lesões mais comuns encontradas na cavidade bucal nos indivíduos com AF são as úlceras aftosas recorrentes. A deficiência leucocitária, que provoca diminuição da imunidade, favorece o aparecimento destas lesões. Úlceras aftosas estão relacionadas à condição hematológica, anemia e neutropenia. Há hipossalivação devido ao uso de fármacos, independente se o paciente foi ou não submetido ao TCTH. A hipossalivação pode acarretar no aumento da prevalência de cárie e na predisposição ao desenvolvimento de infecções⁷. A língua é o sítio de maior prevalência de lesões (69%) como leucoplasias, eritroplasias, líquen plano e CEC. Estas lesões possuem elevado potencial para malignização e são em sua maioria atrofia papilar, língua saburrosa, macroglossia e a pigmentação melânica. DECH é encontrada comumente na mucosa bucal após a realização do TCTH. O CEC é a neoplasia que mais acomete os pacientes com AF. Pode ser encontrado em região de cabeça e pescoço, região anal, vulva e esôfago, porém é mais predominante na cavidade bucal. Pode ainda ser encontrado em revestimento mucoso do trato aéreo-digestivo superior, nasofaringe, orofaringe, laringe

ou hipofaringe. Aproximadamente 65% dos CEC situam-se na cavidade bucal e as regiões mais afetadas são: língua, rebordo alveolar, região retromolar, assoalho e mucosa bucal⁸.

Objetivo

Avaliar a frequência de HPV em pacientes com Anemia de Fanconi (AF) transplantados e não transplantados.

Material e Métodos

Estudo transversal realizado no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas (STMO/HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), serviço de referência para atendimento de pacientes com AF no Brasil e que atualmente acompanha aproximadamente 200 pacientes com a doença, no período de março de 2010 a agosto de 2012. Todos os pacientes foram elegíveis para o estudo, à exceção daqueles com idade inferior a três anos, por dificuldades no procedimento de coleta. A amostra foi extraída de forma não probabilística, por conveniência e de forma sistematizada, com a inclusão dos casos elegíveis presentes no ambulatório nos dias de coleta de dados. Considerou-se como hipótese de nulidade que a frequência de HPV é semelhante entre os pacientes com e sem AF e, considerando os subgrupos com e sem TCTH, que a frequência de HPV é semelhante entre os grupos. Para a hipótese alternativa, o inverso. Para o cálculo do tamanho da mostra foi utilizado o teste para diferença entre proporções, com nível de significância de 5% e poder de teste de 90%, com estimativa calculada de 150 sujeitos (*Software Action +R*[®]). Os pacientes que constituíram o grupo controle foram selecionados de um consultório odontológico particular. Constituíram a amostra de estudo 100 pacientes com AF distribuídos em dois grupos: Grupo A (n = 50) : indivíduos com AF não submetidos ao TCTH; Grupo B (n = 50): indivíduos com AF submetidos ao TCTH. Para o pareamento foram considerados o sexo, a idade e história de contato físico. Os dados examinados incluíram procedência, idade e sexo, hábitos nocivos (uso de álcool e fumo), utilização de colutórios e realização de TCTH, avaliação dos dentes e condição gengival: identificação de lesões cariosas e das gengivas, avaliação

estomatológica e coleta de células bucais. Duas técnicas de identificação do HPV foram utilizadas: o *Abbot RealTime High Risk HPV®* e o *Clart®*. As medidas de tendência central e de dispersão estão expressas em médias e desvio padrão (média \pm DP) e em medianas, valores mínimo e máximo. Foram utilizados o teste t de *Studen*, Anova, teste de Mann-Whitney, Anova de Kruskal-Wallis, teste exato de Fisher e qui-quadrado de Pearson, utilizando-se para os cálculos o *Software Statistica®*. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e todos os participantes assinaram o TCLE.

Resultados

Foram estudados 100 pacientes com Anemia de Fanconi, com média de idade de $11,7 \pm 0,7$ anos, sendo 51 do sexo masculino (51%). Os hábitos registrados foram: uso de álcool (2%), tabagismo (2%), uso de enxaguatórios (7%), beijo (33%), relações sexuais (7%) e uso de preservativos (6%), sem diferença em relação ao grupo controle ($p > 0,05$).

Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao sexo ($p = 0,21$), idade ($p = 0,41$) ou escolaridade ($p = 0,20$). A frequência de pacientes casados foi baixa e semelhante entre os grupos ($p = 0,35$).

Tabela 1

Tabela 2

Em apenas um paciente o exame de HPV foi positivo. Trata-se de um paciente do sexo masculino, com 15 anos, cursando o ensino médio, procedente de Aracaju – SE, portador de Anemia de Fanconi e submetido ao Transplante de Medula Óssea há 96 dias. De hábitos identificou-se apenas o beijo e ao exame físico, uma lesão de tecido mole, sugestiva de leucoplasia.

Foram ainda selecionados 12 pacientes do Grupo AF-T que apresentavam possibilidade de pareamento com pacientes do grupo AF-NT e Controle. Assim, foram selecionados 12 casos, com seus respectivos pares, de acordo com o sexo e idade. No que se refere à idade os grupos foram semelhantes ($p = 0,73$). Os casos foram pareados em relação ao sexo, portanto, cada grupo com seis meninas e seis meninos. Na Tabela

3 estão listadas as frequências de hábitos pesquisados. Na Tabela 4 estão listados os achados de exame físico.

Tabela 3

Tabela 4

Discussão

É bem conhecida a ligação entre o carcinoma anogenital e o cervical uterino com o vírus HPV oncogênico, entretanto, a relação do HPV com o carcinoma bucal ainda não está bem estabelecida. A possível relação do HPV na etiologia das lesões neoplásicas e nas neoplasias malignas bucais foi primeiramente observada em 1983, quando foram descritas alterações citopáticas de HPV (coilocitos) em neoplasias bucais, iguais as encontradas em lesões pré-neoplásicas e carcinomas da cérvix uterina. Mais recentemente, alguns autores reafirmaram a hipótese da participação do HPV na carcinogênese. Um dos tumores sólidos que mais acometem os pacientes com AF são os CEC (carcinoma espinocelular) encontrados na região de cabeça e pescoço, que se desenvolvem após o TCTH, daí a grande importância na realização de exame intrabucal nessa população⁹.

Alguns autores atribuem à terapia imunossupressora prévia ao TCTH realizado nos pacientes com AF, o aumento de incidência de neoplasias, outros atribuem a imunodeficiência, característica da AF, como principal fator¹⁰.

As crianças apresentam menor probabilidade de infectar-se pelo vírus, tendo em vista ainda a pouca exposição ao mesmo. Na literatura observa-se que as maiores prevalências de HPV são encontradas em pacientes com idades até 40 anos, relacionado à prática de sexo oral, anal e oro-genital^{11,12}.

Em apenas um caso houve positividade para HPV não tipificado, em um paciente com AF, submetido ao TCTH, representando 1% do total de casos de AF e 2% do total de casos de AF submetidos ao TCTH. O referido paciente, do sexo masculino, cursando o ensino médio e com 15 anos de idade, proveniente de Aracajú-SE, passou por TCTH 96 dias antes de realizar a coleta para exame de HPV e o contato físico, descrito pelo paciente, foi beijo na boca de uma companheira.

As frequências observadas de 1% do total de casos de AF e de 2% do total de casos de AF submetidos ao TCTH não foram estatisticamente diferentes da negatividade observada nos indivíduos do grupo controle ($p = 0,47$). Assim, a prevalência de HPV não foi maior em portadores de AF e nem tampouco nos pacientes submetidos ao TCTH.

Na população em geral, o vírus HPV tem sido pouco encontrado ou não encontrado em mucosa bucal normal. Em uma pesquisa com 100 estudantes universitários, de 20 a 31 anos, sem história, queixas ou lesões visíveis ao exame físico de cavidade bucal e orofaringe, os estudos por PCR foram todos negativos para HPV¹³, assim como no estudo de Migaldi *et al.*, 2010 em que, de 81 indivíduos italianos, apenas um indivíduo apresentou positividade para HPV bucal (tipificado como HPV 90)¹⁴. Em uma pesquisa realizada com 4.150 crianças em idade escolar e adolescentes com idades entre 10-18 anos, na região de Wielkopolska, na Polônia, 45 indivíduos (1,1%) eram portadores de HPV da orofaringe¹⁵.

Os autores atribuem a baixa da defesa imunológica como fator mais importante no aparecimento da infecção por HPV em outros locais do corpo. Na cavidade bucal, além da IgA, há a presença de enzimas proteolíticas que agem como protetoras contra a infecção pelo HPV. Na literatura, é muito difundido o fato de que as neoplasias malignas bucais estão diretamente ligadas ao consumo do tabaco (fumo) e do álcool. Dentre estes, o maior fator de risco para neoplasia de orofaringe é o tabaco, havendo uma clara relação entre aumento do seu risco, número de cigarros consumidos ao dia e tempo de exposição ao mesmo. Como segundo fator de risco ao desenvolvimento de neoplasias malignas na região de orofaringe aparece o álcool, relacionando-se fortemente a frequência e número de doses. O álcool induz alterações bioquímicas e inflamatórias que atuam sinergicamente na célula de maneira que a lesam, alterando o DNA, resultando em mutações que podem levar à proliferação desordenada das células. Combinando-se o álcool, o cigarro e um reservatório viral, como é considerada a cavidade bucal, pode-se culminar o desenvolvimento de neoplasias¹⁶.

O uso de enxaguatórios com álcool pode expressar efeitos como hiperqueratinização e descamação da mucosa bucal. Este contato pode ser suficiente para expressar efeitos genotóxicos, porém, efeitos diferentes do contato fugaz de quando

se ingere bebidas alcoólicas. Não há ainda total comprovação de que os colutórios com álcool possam interferir na carcinogênese, porém, é aconselhável que sejam usados colutórios com parcimônia, em casos específicos, quando indicados pelo cirurgião dentista e preferencialmente sem álcool¹⁷.

Alguns autores atribuem ao sexo oral um fator de predisposição à infecção, porém, em um estudo onde esta prática sexual foi relatada em 73% dos casos, os resultados para HPV bucal foram negativos. Não se pode afirmar que pacientes com lesão genital e que praticam sexo oral estão de fato mais predispostos a ter HPV na cavidade bucal¹⁸

Nos pacientes com AF que não passaram por TCTH, 15 (30%) apresentaram lesões cariosas, 6 (12%) gengivite e um (2%) leucoplasia. Dos pacientes submetidos ao TCTH, 12 apresentaram lesões cariosas (24%), 4 gengivite (8%), 3 DECH (6%) e 5 leucoplasias (10%). No grupo controle, encontrou-se 6 com lesões cariosas (6%) e 2 com gengivite (4%).

Diversas manifestações bucais da AF são descritas na literatura. Pigmentação melânica em mucosa foi observada em 45% dos pacientes e hematoma em lábio superior e inferior em 30% dos pacientes avaliados por Araujo *et al.* (2007). Dentre alterações bucais associadas ao HPV, é possível destacar as seguintes: papiloma (HPV 6 e 11), condiloma acuminado (HPV 6 e 11), verruga vulgar (HPV 2 e 4), hiperplasia epitelial focal (HPV 13 e 32), líquen plano, leucoplasia (HPV 6, 11 e 16), carcinoma de células escamosas e carcinoma verrucoso⁵.

Apesar da baixa frequência de HPV encontrada nos pacientes com AF, observou-se elevado número de pacientes com lesões leucoplásicas que apresentam grande susceptibilidade para desenvolvimento de CEC. Estes achados chamam a atenção para a necessidade de acompanhamento dos pacientes com AF para detecção precoce de doenças malignas e doenças bucais.

Métodos Laboratoriais de Diagnóstico de HPV

Observa-se inconsistência em relação a detecção da presença do vírus HPV em mucosa bucal normal, lesões pré-malignas e malignas, variando de 0 % a 100%, nos últimos 30 anos em 883 estudos publicados atribuída a vários fatores como diferentes

hábitos das populações estudadas, variações nas técnicas e locais de coleta de amostras e variação nos métodos de detecção do vírus HPV¹⁴.

O HPV pode ser identificado em amostras de células bucais a partir de diversas técnicas mas o PCR é o que apresenta maior sensibilidade, por detectar o vírus quando menos de uma cópia do DNA viral está presente¹⁹.

Nesta amostra foram empregados dois métodos para detecção e tipificação do HPV: o Abbot realTime High Risk – utilizado com todas as amostras (n =150) e o CLART Pappilomavirus humano 2 – utilizado com 36 amostras pareadas quantos ao sexo e idade nos três grupos. As duas técnicas moleculares empregam a reação em cadeia polimerase, que são técnicas extremamente sensíveis e permitem um diagnóstico confiável.

Em um primeiro ensaio utilizou-se o Abbott RealTime HR HPV, um sistema automatizado, qualitativo e em tempo real que detecta 14 tipos de HPV de alto risco, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58,59, 66 e 68. Este teste possui um controle interno para espécimes aderidas de b-globina humana e a cada ensaio controles externos positivos e negativos são incluídos para avaliar a validade da execução²⁰. O teste de HPV de alto risco como o da Abbott RealTime HR detecta infecções associadas a doenças de alto grau enquanto minimiza resultados positivos devido a infecções transitórias de HPV, por equilibrar sensibilidade clínica e especificidade na detecção da doença²⁰. Este pode ser um dos motivos pelos quais não foi detectado HPV nos pacientes com AF, desde que foram pesquisados todos os tipos de HPV.

O CLART Papillomavirus humano 2, que possui alta sensibilidade e permite a detecção de quantidades mínimas de DNA viral, possui também elevada especificidade, ao utilizar uma sequência correspondente a uma região altamente conservada dentro do genoma viral e em sua hibridização posterior possui sondas de captura específicas para cada tipo de HPV. É um método rápido, de fácil padronização em um laboratório hospitalar e capaz de detectar em um único tubo até 35 genótipos de infecções e coinfeções²⁰.

Quantidade e qualidade inadequada de DNA das amostras ou a presença de inibidores de DNA polimerase nas amostras apresentam-se como inconvenientes na

detecção por amplificação genômica, apresentando resultados falso negativos. Com o uso deste kit, estes falsos negativos são eliminados devido a introdução dos controles internos no mesmo tubo de reação onde a amostra é analisada.

Conclusão

A investigação da infecção pelo HPV bucal em Anemia de Fanconi, mas em uma população específica: crianças, adolescentes e adultos jovens. A prevalência de HPV em pacientes portadores de Anemia de Fanconi na amostra estudada foi de 1%. Pacientes com AF não apresentaram diferença em relação a população em geral em relação a prevalência do vírus HPV bucal. A prevalência do HPV bucal não foi influenciada pela realização do TCTH, não foi alterada pelo sexo, idade e hábitos dos indivíduos e pacientes. Observou-se algumas lesões precursoras de neoplasias malignas bucais, como DECH e leucoplasias, e o registro de lesões cariosas e gengivais.

Sabe-se, entretanto, que em muitos carcinomas espinocelulares o HPV é encontrado. Também, sugere-se que a infecção por HPV na orofaringe preceda em 10 anos ou mais o desenvolvimento de neoplasias²¹. Assim, estudos do tipo coorte, com acompanhamento anual dos participantes, podem contribuir para o esclarecimento da instalação do processo de infecção viral e sua participação carcinogênese.

Agradecimentos

CNPQ, Cincinnatti Children's Hospital, St Jude Children's Research Hospital, APACN – Associação Paranaense de Crianças com Neoplasia, Unidade de Transplante de Medula Óssea – Hospital de Clínicas – UFPR.

Referências

1. Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood*. 1994;84(5):1650-5.
2. Kutler DI, Auerbach AD, Satagopan J, Giampietro PF, Batish SD, Huvos AG, Goberdhan A, Shah JP, Singh B. High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;129(1):106-12.
3. De Medeiros CR, Bitencourt MA, Zanis-Neto J, Maluf EMCP, Carvalho DS, Bonfim CMS, Funke VAM, Setubal DC, Pereira NF, Pasquini R. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from an alternative stem cell source in fanconi anemia patients: analysis of 47 patients from a single institution. *Brazilian J Med Biol Res*, 2006;39;1297-1304.
4. Rosenberg PS, Socié G, Alter BP, Gluckman E. Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. *Blood*. 2005;105(1):67-73.
5. Araujo MR, de Oliveira Ribas M, Koubik AC, Mattioli T, de Lima AA, França BH. Fanconi's anemia: clinical and radiographic oral manifestations. *Oral Dis*. 2007;13(3):291-5.
6. Tekcicek M, Tavit B, Cakar A, Pinar A, Unal S, Gumruk F. Oral and dental findings in children with Fanconi anemia. *Pediatr Dent*. 2007;29(3):248-52.
7. Açıkgoz A, Ozden FO, Fisgin T, Açıkgoz G, Duru F, Yarali N, Albayrak D. Oral and dental findings in Fanconi's anemia. *Pediatr Hematol Oncol*. 2005;22(6):531-9.
8. Pasquini R, Neto JZ, Medeiros CR, Bitencourt MA, Bonfim CMS, Moreira VA, Setúbal DC, Flowers MED, Kupka E, Araújo MV. Carcinoma de células escamosas em língua pós-transplante de medula óssea por Anemia de Fanconi *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2003;25(4):239-246.
9. Lowy DR, Gillison ML. A new link between Fanconi anemia and human papillomavirus associated malignancies. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(22):1648-50.

10. Masserot C, Peffault de Latour R, Rocha V, Leblanc T, Rigolet A, Pascal F, Janin A, Soulier J, Gluckman E, Socié G. Head and neck squamous cell carcinoma in 13 patients with Fanconi anemia after hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer*. 2008;113(12):3315-22.
11. Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, Graubard BI, Chaturvedi AK. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA*. 2012;307(7): 693-703.
12. Durzyńska J, Pacholska-Bogalska J, Kaczmarek M, Hanć T, Durda M, Skrzypczak M, Goździcka-Józefiak A. HPV genotypes in the oral cavity/oropharynx of children and adolescents: cross-sectional survey in Poland. *Eur J Pediatr*. 2011;170(6):757–761.
13. Esquenazi D, Bussoloti Filho I, Carvalho Mda G, Barros FS. A frequencia do HPV na mucosa oral normal de indivíduos sadios por meio da PCR. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010;76(1):78-84.
14. Migaldi M, Pecorari M, Forbicini G, Nanni N, Grottola A, Grandi T, Delle Donne G, Leocata P, Trovato D, Sgambato A. Low prevalence of human papillomavirus infection in the healthy oral mucosa of a Northern Italian population. *J Oral Pathol Med*. 2012;41(1):16-20.
15. Terai M, Hashimoto K, Yoda K, Sata T. High prevalence of human papillomaviruses in the normal oral cavity of adults. *Oral Microbiol Immunol*. 1999;14(4):201-5.
16. Molina, PE *et al*. Molecular pathology and clinical aspects of alcohol-induced tissue injury. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002;21(6):120-128.
17. Peláez MAC, Gómez GCE, Ruiz EF, Lapiedra RC. Colutorios con alcohol y su relación con el cáncer oral. Análisis crítico de la literatura. *Med Oral*. 2004;9:116- 23.
18. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klusmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer*. 2004;20;108(5):766-72.
19. Terai M, Takagi M. Human papillomavirus in the oral cavity. *Oral Med Pathol* 2001; 6:1-12.

20. Huang S, Tang N, Mak WB, Erickson B, Salituro J, Li Y, Krumpe E, Schneider G, Yu H, Robinson J, Abravaya K. Principles and analytical performance of Abbott RealTime High Risk HPV test. *J Clin Virol.* 2009;45:13-7.
21. Mork J, Lie AK, Glatre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Møller B, Pukkala E, Schiller JT, Youngman L, Lehtinen M, Dillner J. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2001 Apr 12;344(15):1125-31.

Tabelas

Tabela 1 - Distribuição dos hábitos nos grupos de estudo

Hábitos	AF-NT (n = 50)	AF-T (n = 50)	Controle (n = 50)	p
Álcool	01 (2%)	01 (2%)	01 (2%)	1,00
Tabagismo	02 (4%)	01 (2%)	01 (2%)	0,77
Uso de Enxaguatórios	03 (6%)	04 (8%)	03 (6%)	0,89
Beijo na boca	14 (28%)	17 (34%)	16 (32%)	0,80
Beijo na boca dos pais	00 (0%)	02 (4%)	02 (4%)	0,35
Beijo na boca do companheiro	14 (28%)	16 (32%)	15 (30%)	0,90
Relação Sexual	03 (6%)	04 (8%)	03 (6%)	0,89
Uso de preservativos	06 (12%)	03 (6%)	03 (6%)	0,44

Teste Qui-quadrado de Pearson

Tabela 2 - Distribuição das lesões observadas ao exame físico nos grupos de estudo

Lesão	Controle (n = 50)	AF-NT (n = 50)	AF-T (n = 50)	p
Cárie	06 (12%)	15 (30%)	12 (24%)	0,32
Gengivite	02 (4%)	06 (12%)	04 (8%)	0,33
DECH	00 (0%)	00 (0%)	03 (6%)	0,04
Leucoplasia	00 (0%)	01 (2%)	05 (10%)	0,02
Lesão Aftosa	00 (0%)	03 (6%)	00 (0%)	0,02

Teste Qui-quadrado de Pearson

Tabela 3 - Distribuição dos hábitos nos grupos de estudo

Hábitos	Controle (n = 12)	AF-T (n = 12)	AF-T (n = 12)	p
Álcool	01 (8,3%)	01 (8,3%)	01 (8,3%)	1,00
Tabagismo	02 (16,7%)	01 (8,3%)	01 (8,3%)	0,51
Uso de Enxaguatórios	00 (0%)	00 (0%)	01 (8,3%)	0,97
Beijo na boca	07 (58,3%)	09 (75%)	08 (66,7%)	0,38
Relação Sexual	03 (25%)	02 (16,7%)	04 (33,3%)	0,34
Uso de preservativos	01 (8,3%)	01 (8,3%)	03 (25%)	0,27

Teste Qui-quadrado de Pearson

Tabela 4 - Distribuição das lesões observadas ao exame físico nos grupos de estudo

Lesão	Controle (n = 12)	AF-NT (n = 12)	AF-T (n = 12)	P
Cárie	00 (0%)	03 (35%)	01 (8,3%)	0,02
Gengivite	00 (0%)	00 (0%)	00 (0%)	1,00
DECH	00 (0%)	00 (0%)	01 (8,3%)	1,00
Leucoplasia	00 (0%)	00 (0%)	01 (8,3%)	1,00
Lesão Aftosa	00 (0%)	00 (0%)	00 (0%)	1,00

Teste Qui-quadrado de Pearson